

UV-B-Induzierte Genexpression
bei der Buche
***Fagus sylvatica* L.**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Ingrid Liegl
aus Vohenstrauß

1999

Eingereicht in die Fakultät: 03. Mai 1999

Mündliche Prüfung: 20. März 2000

Referent: Prof. Dr. H. Sandermann

Koreferent: PD Dr. F. Thümmeler

Teile der vorliegenden Arbeit sind publiziert:

Ernst D., Liegl I., Schnitzler J.-P. Schnitzler, Jungblut T.P., Zinser C., Köfferlein M., Schmelzer E., Heller W., Sandermann H. Jr. (1996): UV-B-induced gene expression in european beech and scots pine. In: Ahuja M.R. Boerjan W., Neale D.B. (eds.): Somatic cell genetics and molecular genetics of trees. Kluwer Academic publishers. Printed in Netherlands: 273-276.

Liegl I., Ernst D., Sandermann H. Jr. (1997): Differentielles Display RT-PCR bei der Buche (*Fagus sylvatica* L.) mit Hilfe des Expand™ High Fidelity PCR Systems. In: Boehringer Mannheim GmbH (ed.): Biochemica Information Sonderheft, PCR Bibliographie anlä ß lich des PCR Award for young scientists. Druckerei Munz, Mannheim-Sandhofen. (ISSN 0942-556X): 22-23.

Meinen Eltern
und Harald und Petra

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
1.	Abnahme der stratosphärischen Ozon-Schicht	1
2.	UV-B-Effekte	2
2.1.	UV-B-Effekte auf zellulärer und molekularer Ebene	2
2.2.	Schutzmechanismen von Pflanzen gegen UV-B	6
2.3.	Signaltransduktion und mögliche UV-B-Photorezeptoren	8
2.3.1.	Mechanismen der Signaltransduktion	9
2.4.	UV-B-Effekte in Abhängigkeit von den allgemeinen Lichtbedingungen (Photosynthetic Active Radiation = PAR)	11
3.	Ozon-Effekte auf Zell- und Genebene	12
4.	Kombinationseffekte nach UV-B- und Ozon-Behandlung	15
5.	Zielsetzung	16
II.	Material und Methoden	18
1.	Material	18
1.1.	Chemikalien	18
1.2.	Verwendete Puffer und Lösungen	18
1.3.	Enzyme	19
1.4.	Verbrauchsmaterialien	19
1.5.	Geräte	20
1.6.	Bestimmung der Radioaktivität durch Flüssigkeits-Szintillationszählung	20
1.7.	Protokolle für die verwendeten Gele	20
2.	Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen der <i>Fagus sylvatica</i> L.-Keimlinge	21
3.	Behandlung der Sämlinge mit verschiedenen abiotischen Faktoren	21
3.1.	UV-B-Exposition der Buchensämlinge	21
3.1.1.	Aufbau der UV-Prototyp-Kammer	21
3.1.2.	Exposition der Buchensämlinge	23
3.2.	Ozon-Behandlung der Buchensämlinge	23
3.3.	Durchgeführte Experimente	24
4.	Ernte des Pflanzenmaterials	24
5.	Extraktion des löslichen Gesamtproteins aus den Primärblättern der Buche (<i>Fagus sylvatica</i> L.)	25
5.1.	Proteinbestimmung	25
5.2.	Fällung des Proteins	25

5.3.	Verschiedene Protein-Extraktionspuffer im Vergleich	26
6.	2D-PAGE des löslichen Gesamtproteins	26
6.1.	Bestimmung des Protein-Verlustes durch die TCA-Fällung	27
6.2.	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	27
6.3.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
6.3.1.	Färbung der Proteingele	28
6.3.2.	Auswertung der Gele	28
7.	RNA-Extraktion	29
7.1.	Isolierung der poly (A) ⁺ -RNA	29
7.2.	<i>In vitro</i> Translation	29
8.	2D-PAGE der <i>in vitro</i> translatierten Proteine	29
8.1.	Isoelektrische Fokussierung (IEF) der <i>in vitro</i> translatierten Proteine	30
8.2.	SDS-Gelelektrophorese der <i>in vitro</i> translatierten Proteine	30
9.	Differential Display RT-PCR (DDRT-PCR)	31
9.1.	Einzelstrang-cDNA-Synthese (ss-cDNA-Synthese)	31
9.1.1.	RNA-Isolierung	31
9.1.2.	Größenbestimmung der Einzelstrang-cDNA	31
9.2.	Die Methode des Differentiellen Displays (DDRT-PCR)	32
9.2.2.	cDNA-Synthese und Differentielles Display	33
10.	Klonierung der differentiellen UV-B-Amplifikate	34
11.	Transformationskontrolle mittels Kolonien-PCR	34
12.	Isolierung der Plasmid-DNA	34
13.	Sequenzieren der UV-Buchenklone	34
13.1.	Datenbankvergleich der Sequenzen der Buchenklone	35
14.	Restriktionsverdau der Plasmid-DNA	35
15.	Dot-Blot Analyse der Insert-DNA der Buchenklone	36
15.1.	Herstellen eines Dot-Blots	36
15.2.	Radioaktive Zufallsmarkierung der Sonde mit [³² P]-dATP	36
15.3.	Hybridisieren der Dot-Blot Membran	36
15.4.	Wiederholtes Hybridisieren der Membran - Entfernen der Gensonde	37
16.	Northern-Blot Analyse der Buchenklone	37
16.1.	Erstellen einer Northern-Blot Membran	37
16.2.	Hybridisierung der Northern-Blots	38
17.	Amplifizierung der 3'- und 5'-Enden der cDNA einzelner Klone	38
17.1.	5'-RACE (= rapid amplification of cDNA ends)	38
17.2.	Amplifizierung der 3'-Enden der cDNA	39

III.	Ergebnisse	40
1.	2D-PAGE des löslichen Gesamtproteins der Primärblätter	41
1.1.	Molekulargewichts (MG)-Angaben und Isoelektrische Punkte (pI) der quantifizierten löslichen Gesamtproteine	43
1.2.	Tageszeitliche Änderungen des Gesamtproteinmusters nach UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle	43
1.2.1.	UV-B-abhängige Proteine	48
1.3.	Tageszeitliche Änderungen des Gesamtproteinmusters unter Starklicht-Exposition bezogen auf den Starklicht-Nullwert	48
2.	2D-PAGE der <i>in vitro</i> translatierten Proteine	48
2.1.	MG-Angaben und pI-Werte der quantifizierten <i>in vitro</i> translatierten Polypeptide	50
2.2.	UV-B-induzierte bzw. -reprimierte <i>in vitro</i> translatierte Proteine im Vergleich zu den entsprechenden Starklicht-Kontrollen	55
2.2.1.	Induzierte <i>in vitro</i> translatierte Proteine zur Ernte 3 (nach 3 h UV-B-Exposition) im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle	56
2.2.2.	Reprimierte <i>in vitro</i> translatierte Proteine zum Erntezeitpunkt 3 (d.h. nach 3 h UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle)	56
2.2.3.	Induzierte und reprimierte <i>in vitro</i> translatierte Proteine nach 6 h erhöhter UV-B-Bestrahlung im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle (Ernte 4)	56
2.2.4.	<i>In vitro</i> translatierte Proteine, die während der ersten 3 h UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle unverändert blieben, aber nach 6 h UV-B reprimiert wurden (Ernte 4)	57
2.2.5.	Zum Erntezeitpunkt 5 <i>in vitro</i> translatierte Proteine im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle	57
2.2.6.	<i>In vitro</i> translatierte Proteine nach UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle, die zu den Erntezeitpunkten 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 induziert oder reprimiert wurden	58
2.2.7.	Neue und nicht mehr nachweisbare <i>in vitro</i> translatierte Protein-spots durch erhöhte UV-B-Exposition	59
2.2.8.	Zusammenfassung der nach UV-B-Exposition <i>in vitro</i> translatierten Proteine im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle	60
2.3.	Tageszeitliche Änderungen der mRNA-Transkripte unter Starklicht-Exposition bezogen auf den Starklicht-Nullwert	61
2.3.1.	Neuinduzierte <i>in vitro</i> translatierte Proteine während der Starklicht-Exposition im gesamten Verlauf	62
2.3.2.	Induzierte <i>in vitro</i> translatierte Proteine nach 4 h Starklicht-Exposition (Ernte 2)	63

2.3.3.	Reprimierte <i>in vitro</i> translatierte Proteine nach 4 h Starklicht-Exposition (Ernte 2)	63
2.3.4.	Induzierte <i>in vitro</i> translatierte Proteine nach 7 h Starklicht-Exposition (Ernte 3)	63
2.3.5.	Induzierte und reprimierte <i>in vitro</i> translatierte Proteine nach 10 h Starklicht-Exposition (Ernte 4)	64
2.3.6.	Neue und nicht mehr nachweisbare <i>in vitro</i> translatierte Proteinspots nach Starklicht-Exposition im Tagesgang	64
3.	Isolierte Klone mittels der DDRT-PCR nach erhöhter UV-B-Behandlung	66
3.1.	Optimierung und Durchführung der DDRT-PCR	66
3.2.	Vorselektion möglicher positiver Klone	68
3.3.	Effekte anhand der Northern-Blot Analysen	69
3.3.1.	Klone in Abhängigkeit von erhöhter UV-B-Exposition	69
3.3.2.	Klone in Abhängigkeit von Starklicht-Behandlung	72
3.3.3.	Durch erhöhte Ozon-Konzentration (300 ppb) induzierte Klone	74
3.3.4.	Klone in Abhängigkeit von erhöhter UV-B/Ozon-Behandlung	77
3.3.5.	Zusammenfassung der Northern-Blot Analysen	78
3.4.	Sequenzanalysen von UV-B-induzierten Buchen-Klonen (=UV-I)	79
3.4.1.	Klon UV-I 1/28-1	79
3.4.2.	Klon UV-I 1/28-2	81
3.4.3.	Klon UV-I 5/29-2	82
3.5.	Sequenzanalysen von UV-B-reprimierten Klonen (= UV-R)	83
3.5.1	Klon UV-R 1/28-1	83
3.5.2.	Klon UV-R 2/28-1	84
3.5.3.	Klon UV-R 10/28-1	85
3.5.4.	Klon UV-R 10/28-3	86
3.5.5.	Klon UV-R 12/29-1	86
3.6.	Zusammenfassung der identifizierten DDRT-PCR-Buchen-Klone	87
IV.	Diskussion	88
1.	Gibt es eine Übereinstimmung der 2D-PAGE Analysen auf mRNA- und Gesamtproteinebene nach erhöhter UV-B-Exposition?	89
2.	Überwiegend vorkommende Induktionsverläufe der Proteine auf Translations- und löslicher Gesamtproteinebene	90
3.	Starke Reprimierung auf Gen- und Proteinebene nach UV-B-Exposition	92
4.	Induktion auf Gen- und Proteinebene nach UV-B-Exposition	93
4.1.	Durch UV-B-Exposition vermittelte Induktion/ Repression von überwiegend sauren <i>in vitro</i> translatierten Proteinen	93

4.2.	Charakteristische Proteinspots auf löslicher Gesamtprotein- und <i>in vitro</i> Translationsebene nach UV-B-Exposition	94
5.	Die Vor- und Nachteile des Differentiellen Displays	96
6.	UV-B-induzierte Buchenklone mit geringen Homologien in der Datenbank	99
6.1.	UV-I 1/28-1 zeigte in der Datenbank Homologien zu „ABI-3“	100
6.2.	UV-I 5/29-2 zeigte in der Datenbank Homologien zu einem „phytochrome regulated gene“	101
6.3.	UV-I 10/28-2 zeigte in der Datenbank Homologien zur „Squalen synthase“	102
7.	UV-B-reprimierte Buchenklone mit geringer Ähnlichkeit	103
7.1.	UV-R 10/28-1 zeigte in der Datenbank Homologien zu „Peroxidase“	103
7.2.	UV-R 10/28-3 zeigte in der Datenbank Homologien zu „DNA directed RNA-Polymerase alpha chain“	103
7.3.	UV-R 12/29-1 zeigte in der Datenbank Homologien zu „ara-3, ras-related GTP-binding protein“	103
8.	Buchenklone mit signifikanter Ähnlichkeit im Datenbankvergleich	104
8.1.	UV-R 2/28-1 zeigte in der Datenbank große Homologien zur „nascent polypeptide associated complex alpha chain“	104
8.2.	Das ribosomale Protein L37 - induziert durch erhöhte UV-B-Exposition	107
8.2.1.	Mögliche Funktionen des ribosomalen Proteins	109
V.	Zusammenfassung	114
VI.	Literaturverzeichnis	117
VII.	Anhang	140

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

2D-PAGE	2-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
AMP	Ampicillin
AS	Aminosäuren
atp B, atp C, atp E	Transkripte der Untereinheiten der ATP-Synthase
ATP,CTP,GTP,TTT	Adenosin-, Cytidin-, Guanosin-, Thymidin-5'-triphosphat
Bisacrylamid	N,N'-Methylenbisacrylamid
bp, kb	Basenpaar(e), Kilobasenpaare
BSA	Bovin serum albumin (Rinderserumalbumin)
cab	Transkript des Chlorophyll <i>a/b</i> -bindenden Proteins
	Carboxylase/Oxygenase
cDNA	komplementäre (copy) DNA
CF ₀ F ₁ -ATPase	ATP-Synthase-Komplex des Chloroplasten (C) bestehend aus F ₀ - und F ₁ -Protein
Ci	Curie
cpm	Zählimpulse pro Minute
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
Da, kDa	Dalton (g/mol); Kilodalton
DDRT-PCR	Differentielles Display Reverse Transkriptase PCR
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddNTP	deaza-deoxy-Nukleotid-triphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	deoxy-Nukleotid-triphosphate
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Versuch
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis (β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (Enzym-gekoppelter immunologischer Nachweis)
F ₁ -ATPase-β, -ε	F ₁ -ATP-Synthase-Untereinheiten β und ε
g	Erdbeschleunigung bei Zentrifugationen
h	Stunde (hour)
IAA	Isoamylalkohol
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
l	Liter
MEZ	Mitteuropäische Zeit
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten (messenger) RNA

n	Anzahl
n.b.	nicht bestimmt
n.n.	nicht nachgewiesen
ORF	Open Reading Frame
PAR	Photosynthetic Active Radiation (400 - 700 nm)
PCR	Polymerase Chain Reaction
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PR	pathogenesis related
psbA	Transkript des Gens des D1-Proteins
PVP	Polyvinylpyrrolidin
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RACE	rapid amplification of cDNA ends
rbcL, rbcS	Transkripte Gene der Untereinheiten der Ribulose- 1,5 – biphosphat- Carboxylase/Oxygenase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RubisCo	Ribulose-1,5-biphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SDS	Sodium-dodecyl-sulphate (Natriumdodecylsulfat)
s	Sekunde
ss-cDNA	single stranded-copy DNA (einzelsträngige komplementäre DNA)
TAE	Tris-Acetate-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)
TE	Tris-EDTA-Puffer
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
UV-A	Ultraviolette Strahlung A (320 - 380 nm)
UV-B	Ultraviolette Strahlung B (280 - 320 nm)
UV-B _{BE}	Biologisch effektive Bestrahlungsstärke nach Caldwell (1971), normalisiert bei 300 nm
UV-C	Ultraviolette Strahlung C (< 280 nm)
v:v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
w/v	Gewichtsanteil (weight/volume)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranosid

I. EINLEITUNG

Während der Vegetationsperioden sind Pflanzen verschiedenen abiotischen und biotischen Stressoren ausgesetzt. Dazu zählen neben Hitze, Kälte, Frost, Salz- und Trockenstreß, verschiedene Lichtbedingungen sowie die Bodenansäuerung, zusätzliche atmosphärische Verunreinigungen, wie z. B. Ozon, SO_2 (Guderian et al., 1990) und infolge der abnehmenden stratosphärischen Ozon-Konzentration (Caldwell et al., 1989) eine erhöhte UV-B-Strahlung (280 - 320 nm). Pflanzen reagieren auf diese Streßsituationen durch die Induktion bzw. Repression verschiedener Enzyme.

1. Abnahme der stratosphärischen Ozon-Schicht

Während des australischen Frühlings wurde zum ersten Mal von der Abnahme der Ozon-Schicht über der Antarktis berichtet (Farham et al., 1985). Durch die Zivilisation werden vermehrt Fluorchlorkohlenwasserstoffe und andere Halogene in die Atmosphäre abgegeben; infolge der Interaktion der Fluorchlorkohlenwasserstoffe mit Ozon ist die Reduktion der stratosphärischen Ozon-Schicht zu beobachten (Cicerone, 1987). Aus Fluorchlorkohlenwasserstoffen werden durch die Einwirkung der energiereichen UV-Strahlung Chloratome freigesetzt, welche in den Abbauprozess von Ozon involviert sind. Dadurch erfolgt die Störung der Gleichgewichtsreaktion (stratosphärische Ozon-Bildung aus Sauerstoffmolekülen durch Lichtenergie und Ozon-Abbau durch Chloratome), was den Abbau der stratosphärischen Ozon-Schicht bedingt (Toon & Turco, 1991; Cicerone, 1987).

Aufgrund der abnehmenden Ozon-Schicht in der Stratosphäre nimmt die UV-B-Strahlung (280 - 320 nm) auf der Erdoberfläche zu. Ozon gilt als atmosphärische Hauptkomponente, die Strahlung kleiner 300 nm absorbieren kann (Jordan, 1996). UV-C (< 280 nm) wird durch Ozon vollständig ausgeschlossen und UV-A (320 - 380 nm) wird nicht absorbiert. Aus diesem Grund variiert durch geringe Veränderungen der globalen stratosphärischen Ozon-Schicht allein der Anteil der UV-B-Strahlung. Der UV-B-Gehalt an der Gesamtstrahlung auf der Erdoberfläche liegt bei ca. 0.3 % (Bavcon et al., 1996). Allgemein wird pro 1% Abnahme der Ozon-Schicht eine 1,5- bis 2-fache Zunahme der UV-B-Strahlung erwartet (Jordan, 1996).

Die von der Meßstation Hohenpeißenberg vorliegenden Daten zeigen, daß die kontinuierliche 1%-ige Reduktion der stratosphärischen Ozon-Schicht nicht über die Jahrzehnte anhält: in den 70-iger Jahren und Anfang 1990 wurde eine stetige Abnahme der Ozon-Konzentration in der unteren Stratosphäre und eine Zunahme des troposphärischen Ozons beobachtet (Metz, 1995; s. Abb. 1).

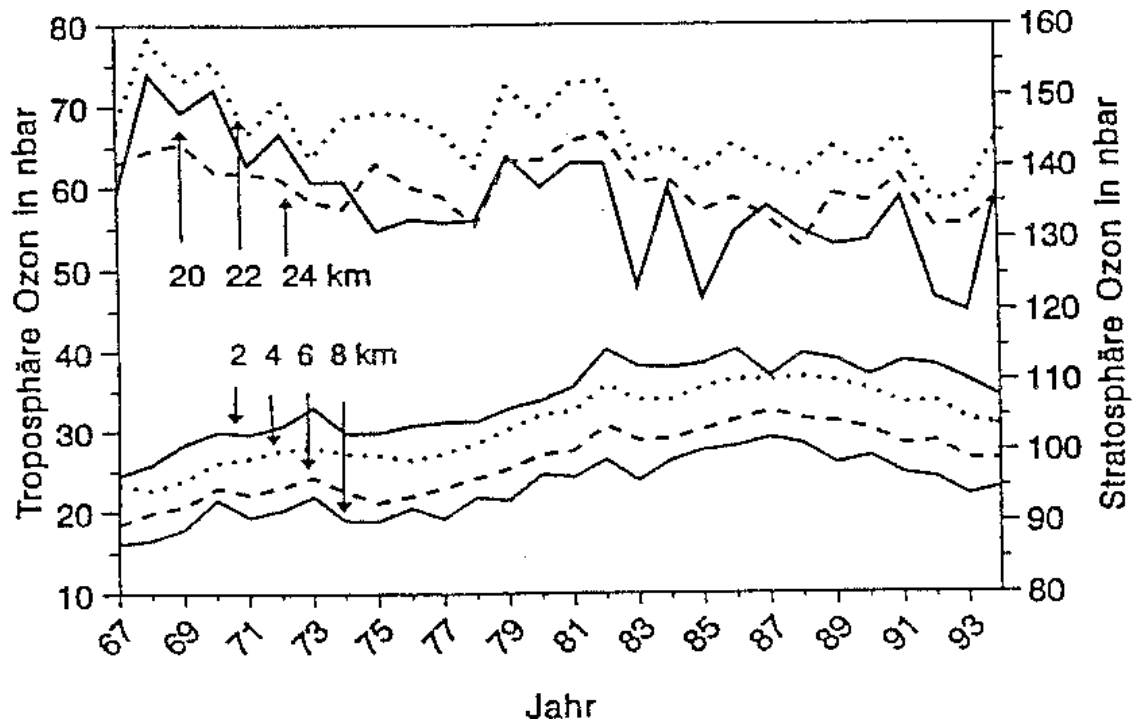


Abb. 1.: Stratosphärische und troposphärische Ozon-Konzentrationen in verschiedenen Höhen über der Meßstation Hohenpeißenberg von 1967 bis 1994 im zeitlichen Verlauf (Metz, 1995).

2. UV-B-Effekte

2.1. UV-B-Effekte auf zellulärer und molekularer Ebene

Pflanzen sind konstant dem Sonnenlicht exponiert, weshalb sie sich gegen UV-B-Strahlung schützen müssen. Innerhalb einer Art kann es UV-B-sensible, aber auch -unsensible Varietäten geben. Barnes et al. (1987) zeigten, daß die Empfindlichkeit von Pflanzen gegenüber UV-B in Abhängigkeit vom natürlichen Standort steht: Pflanzen in Höhenlagen oder in Äquatorregionen sind weniger empfindlich gegenüber UV-B als Pflanzen in anderen Regionen.

Zu den UV-B-bedingten physiologischen Effekten bei Pflanzen (Bornman, 1989) zählen z. B. die Reduktion der Pollenkeimung (Flint & Caldwell, 1984), der pflanzlichen Biomasse (Teramura et al., 1990; Nogués et al., 1998), der Blattfläche oder der Pflanzenhöhe (Tevini & Teramura, 1989; González et al., 1998), die Schädigung der Chloroplastenstruktur (He et al., 1994) sowie des Photosystems – insbesondere des Photosynthesekomplexes II (Iwanzik et al., 1983; Wilson & Greenberg, 1993; Bornman, 1989; Strid et al., 1990; Jansen et al., 1996). Zudem wurden Veränderungen in der Epidermis (einschließlich Kutikula und Hypodermis) und ansteigende Flavonoid- und/oder Anthocyangehalte nachgewiesen. Diese sekundären Inhaltsstoffe werden als Schutzpigmente gegenüber der energiereichen UV-B-Strahlung synthetisiert (Tevini et al., 1981; Schnitzler et al., 1996; Lavola, 1998) und in der Epidermis

akkumuliert (Hahlbrock & Scheel, 1989). Diese und andere Untersuchungen belegen, daß die UV-B-Strahlung das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen beeinflusst (Jenkins et al., 1995).

Zu den frühen Effekten der UV-B-Strahlung zählen: die Abnahme der Transkripte der an der Photosynthese beteiligten Enzyme sowie weiterer Chloroplastenproteine, die Induktion der Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels und der des antioxidativen Systems. Bereits nach wenigen Stunden UV-B-Exposition wurde eine Zunahme der Transkripte des Phenylpropanstoffwechsels, wie z.B. der Phenylalanin-ammonium-lyase, der Chalkonsynthase und der 4-Coumaryl-CoA-Ligase nachgewiesen (Strid et al., 1994). Neben der Transkriptinduktion des Phenylpropanstoffwechsels erfolgte auch eine Antwort des antioxidativen Systems: bei *Pisum sativum* die Induktion der Glutathionreduktase und Repression der Superoxiddismutase (Strid, 1993), bei *Arabidopsis thaliana* L. die Induktion einiger Peroxidaseenzyme und eine gesteigerte Aktivität der membranlokalisierten NADPH-Oxidase (Rao et al., 1996). Bei *Nicotiana plumbaginifolia* L. zeigten Willekens et al. (1994) nach UV-B-Behandlung die Induktion der Katalase 2, der Katalase 3 und der cytosolischen Glutathionreduktase. Green & Fluhr führten 1995 die UV-B-vermittelte Signalkaskade, die zur Expression von Pathogenesis Related (PR) Proteinen im Tabak führte, auf reaktive Sauerstoffspezies zurück. Bei Erbsenblättern, exponiert unter erhöhter UV-B-Strahlung, wurde ein Anstieg des oxidierten Glutathion-, Gesamt-Glutathion-, Nikotinamid- und Trigonellingehalts parallel zur Induktion der Chalkonsynthase und der Phenylalanin-ammonium-lyase gezeigt (Kalbin et al., 1997); ein Anstieg des Nikotinamid- und Trigonellinspiegels wird nur bei UV-B-Bestrahlungsintensitäten nachgewiesen, die oxidativen Stress auslösen.

Hauptsächlich beschriebene UV-B-Effekte bei Pflanzen zeigten sich im Chloroplasten anhand der Veränderungen des Photosystem II - Komplexes (Bavcon et al., 1996). Wobei zuerst eine Abnahme der mRNA-Transkripte für Kern-kodierte Gene und später eine Abnahme der Transkripte Chloroplasten-kodierter Gene stattfand (Strid et al., 1994): zu den Kern-kodierten zählen die Transkripte *cab*, *rbcS* und γ -CF₁-ATPase und zu den Chloroplasten-kodierten die Transkripte *rbcL*, *psbA*, CF₁-ATPase β , und $-\epsilon$, Cytochrom *b* und Untereinheit (UE) IV des Cytochrom *b/f*-Komplexes (s. Tab. 1).

Tab. 1.: Abnahme der Transkripte der Gene nach UV-B-Exposition (Strid et al., 1994).

Kern-kodierte Gene	Plastidär-kodierte Gene	Proteine
<i>cab</i> -Gen	<i>psbA</i> Gen	Chlorophyll A/B bindendes Protein (<i>cab</i>), D1-Protein (<i>psbA</i>)
<i>atpC</i> - Gen	<i>atpB</i> - und <i>atpE</i> - Gen	UE der ATP-Synthase
<i>rbcS</i> - Gen	<i>rbcL</i> - Gen	UE der Ribulosebiphosphat-Carboxylase (RubisCo)

Die Effekte auf Transkriptebene erfolgten schnell (nach 4 Stunden (h): *cab* und *rbcS*) oder langsam (nach 3 Tagen: *psbA*). Chloroplasten-kodierte Veränderungen erstreckten sich über einen längeren Zeitraum als Kern-kodierte. Zhang et al. (1994) belegten z.B., daß die mRNA des Cytochrom b/f-Komplexes durch UV-B stark reduziert wurde, aber das entsprechende Protein unbeeinflusst blieb.

Dies erklärte Taylor (1989) durch unterschiedliche Regulationsmechanismen: die Kontrolle Kern-kodierter Gene fand hauptsächlich auf Transkriptebene statt - durch Hemmung der Transkription nahm die mRNA-Konzentration ab. Im Gegensatz dazu erfolgte die Regulation der Expression Plastidär-kodierter Gene auf Translations- und/oder- Posttranslationsebene. Mackerness et al. (1997) beschrieben diesen Regulationsmechanismus für die Protein-spiegel der LSU und des D1-Polypeptid des Photosystems II anhand von Studien an *Pisum sativum* L.; im weiteren Verlauf nach UV-B-Exposition zeigten sie eine spätere Regulation auf Transkriptebene. Die Regulation der UV-B-vermittelten Expression der *psbA2* und *psbA3* Gene findet bei dem Cyanobakterium *Synechocystis* 6803 zumindest teilweise auf Transkriptionsebene statt (Mate et al., 1998).

Die Abnahme der Genexpression nach UV-B-Exposition könnte durch direkte DNA-Schäden, indirekte oxidative Schäden (bewirken eine veränderte Signaltransduktion) oder unter der Beteiligung von UV-B-Rezeptoren bedingt sein (Strid et al., 1994). Green & Fluhr (1995) belegten, daß in Tabak-Blättern durch UV-B das Transkript des PR-1 und dessen Protein induziert wurde; diese Induktion erfolgte indirekt über reaktive Sauerstoffspezies. Ebenso wurde eine Korrelation des Anstiegs des endogenen Salicylsäurespiegels und der Aktivierung der PR-Gene festgestellt; der Grund dafür ist in Tabak die *in vitro* Blockierung der Katalase-Aktivität des Salicylsäure-bindenden Proteins durch Salicylsäure (Chen et al., 1993). Eine weitere Studie an transgenen NahG *Arabidopsis* Pflanzen, welche Salicylsäure nicht akkumulieren können, zeigte, daß infolge UV-B-Exposition ein Anstieg an PR-Transkripten, aber keine Abnahme der Photosynthese Transkripte (Chlorophyll a/b bindendes Protein und D1 Polypeptid des Photosystems II) erfolgt. Für diese zwei Genfamilien existieren folglich zwei voneinander unabhängige Signaltransduktionswege: die Repression der Photosynthesegene ist zwar abhängig von den reaktiven Sauerstoffspezies, aber unabhängig von Salicylsäure, und die Induktion der sauren PR-Gene hingegen ist sowohl an die reaktiven Sauerstoffspezies als auch an die Salicylsäure gekoppelt (Surplus et al., 1998). Ob Salicylsäure im Signaltransduktionsweg den reaktiven Sauerstoffspezies vor- oder nachgeschaltet ist, wurde bisher nicht eindeutig belegt (Chen et al., 1993; Bi et al., 1995; Neuenschwander et al., 1995). Die Daten von Surplus et al. (1998) weisen darauf hin, daß die reaktiven Sauerstoffspezies im Signalweg vor der Salicylsäure liegen. Untersuchungen mit Blättern von transgenem Tabak zeigten, daß die UV-B-vermittelte Induktion des Nopalin Synthase (*nos*) Promotors durch reaktive Sauerstoffspezies erfolgt (Yu

et al., 1998). Bei der exogenen Applikation von reduziertem Glutathion oder anderen Thiol reduzierenden Verbindungen wurde die Akkumulierung reaktiver Sauerstoffspezies verhindert, wodurch der Transduktionsprozeß des UV-B-Signals zum *nos* Promotor unterbrochen wurde. Humane Fibroblasten-Zellen, die mit H_2O_2 oder UV-B behandelt wurden, gaben Hinweise dafür, daß Katalasen eine primäre Schutzfunktion gegenüber oxidativem Stress besitzen; Glutathion-Peroxidasen hingegen schützen die Zellen vor Schäden bei sehr hohen H_2O_2 -Konzentrationen (Masaki et al., 1998).

UV-B-Exposition bewirkte eine ähnliche Aktivierung der Prozesse der Lipidperoxidation wie nach einer Elicitor- (Doke et al., 1994) oder Ozon-Behandlung (Schraudner et al., 1997): primäre Radikale – entstanden nach UV-B-Exposition – reagieren mit ungesättigten Fettsäuren; diese können über Kettenreaktionen zu Fettsäureperoxyradikale führen und durch die gehäuften Bindungen zwischen Fettsäureresten in einer Lipidperoxidation resultieren, was den Verlust der Membranfluidität bedingt (Elstner, 1988). Die Detoxifizierung der Lipidperoxyradikale und der primären Radikale ist durch die Reaktion mit Radikalfängern, wie Ascorbat oder α -Tocopherol, möglich (Foyer et al., 1994).

Die RubisCo-Aktivität wurde infolge einer UV-B-Exposition inhibiert. Der Grund dafür liegt vermutlich im Proteinabbau oder der Inaktivierung des Enzyms. Jordan et al. (1992) zeigten mittels einer UV-B-Studie an Erbse, daß die Enzymaktivität schneller als der Proteingehalt der RubisCo abnimmt. Desweiteren belegten 1994 Garcia-Ferris & Moreno, daß der RubisCo-Abbau unter oxidativen Streßbedingungen stattfindet. Möglicherweise wird das RubisCo-Holoenzym gespalten, z.B. durch UV-B-Absorption aromatischer Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin), was zu einer Ringöffnung oder im Beispiel von Tyrosin zur Entstehung freier Radikale führen könnte (Jordan, 1996). Ebenso wären Schäden innerhalb des Chloroplasten durch die Entstehung freier Radikale nach UV-B-Exposition möglich. Diese Radikale können mit nukleophilen Aminosäureseitenketten wie Cystein-SH, Lysin und Arginin-NH₂ und aromatischen Aminosäuren reagieren. Solche Angriffe bewirkten eine verstärkte Hydrophobizität des Proteins, teilweise Zerstörung und einen Verlust der katalytischen Aktivität (Cadenas, 1989).

Eine weitere UV-B-vermittelte Änderung der Photosynthese beruhte auf der Hemmung der Photophosphorylierung innerhalb des Chloroplasten und der Abnahme der CF_0F_1 -ATPase-Aktivität in Erbsenblättern (Strid et al., 1990). Die Enzymaktivität nahm im Vergleich zum Proteingehalt weniger ab, weshalb das restliche Protein – im Gegensatz zu RubisCo - zusätzlich aktiviert werden muß; diese Aktivierung könnte über eine Reduktion von Disulfidbrücken der Cysteinreste innerhalb der γ -Untereinheit der CF_1 -ATPase stattfinden (Zhang et al., 1994).

UV-B-induzierte Veränderungen auf Genexpressionsebene werden bei *Arabidopsis* durch entwicklungsbedingte und zelluläre Faktoren beeinflusst (Jordan et al., 1998). Das Ausmaß

der UV-B-induzierten Veränderungen auf Genexpressionsebene ist nach Jordan (1996) von folgenden Faktoren abhängig:

- Spezifischer Lichtaufnahme über Photorezeptoren oder unspezifischer durch biologisch bedeutende Moleküle.
- Dem Eindringen der UV-B-Strahlung in das Gewebe: abgeschwächt durch die Pigmenteinlagerung in den Epidermiszellen. Durch die Morphologie der Pflanzen und die Pigmentzusammensetzung ergeben sich Unterschiede: Koniferen < Monokotyle < krautige Pflanzen. Die UV-B-Exposition verändert die Blattmorphologie und die Pigmentverteilung, wodurch das Eindringen der UV-B-Strahlung beeinflusst wird.
- Den DNA-Schäden und der Effizienz der Reparaturmechanismen.
- Der indirekten Regulation der Genexpression, z.B. durch oxidative Schäden oder metabolische Rückkopplungs-Mechanismen.
- Der Entwicklungsstufe des exponierten Gewebes: etioliertes Gewebe ist weniger empfindlich als chlorophyllhaltiges Gewebe und ausdifferenziertes Gewebe ist wiederum empfindlicher als jüngeres Gewebe.
- Den Wechselwirkungen mit anderen Umweltparametern: Expositionen unter hohen PAR-Intensitäten reduzieren das Ausmaß von UV-B-induzierten Schäden, ebenso verändern Pathogene oder Ozon die Genexpression.

2.2. Schutzmechanismen von Pflanzen gegen UV-B

Gegen UV-B-Strahlung verfügen Pflanzen über mehrere Schutzmechanismen. Unter anderem werden z.B. überwiegend in den Vakuolen der Epidermis und in den subepidermalen Zellschichten Flavonoidpigmente eingelagert (Caldwell et al., 1983).

Durch die Akkumulation solcher Schutzpigmente in der Epidermis, wie Flavonoiden, Anthocyanen und Hydroxyzimtsäure-Derivaten, wird die energiereiche UV-B-Strahlung absorbiert (Cen & Bornman, 1993; Kootstra, 1994; Schnitzler et al, 1996; Lavola, 1998). Dadurch werden Schäden auf DNA-, RNA- und Proteinebene reduziert oder sogar verhindert.

Der UV-Schutz bei Laubbäumen ist im Vergleich zu immergrünen Pflanzen geringer: die Begründung dafür liegt in der Konzentration der UV-B-absorbierenden Verbindungen sowie der Epidermisdicke (einschließlich Kutikula und Hypodermis), welche eine unterschiedliche Transmission der Epidermis bedingt (Day et al., 1993). Bei einzelnen Pflanzen existieren große Unterschiede in der Epidermis-Transmission: Koniferen-Nadeln sind im Vergleich zu krautigen Dikotyledonen optimal geschützt; die Getreidearten und holzigen Dikotyledonen liegen dazwischen (Day et al., 1992). Das Eindringen der UV-B-Strahlung in die Schichttiefe von Blättern kann über die Faseroptik-Methode gemessen werden: in Nadeln gelangt UV-

Strahlung in eine Tiefe bis 17 μm , in Blättern von krautigen Pflanzen hingegen bis 150 μm (Day et al., 1993). Mikroskopische Epidermisschicht-Untersuchungen zeigten desweiteren, daß die UV-B-Strahlung in krautigen Pflanzen antiklinal durch die Zellwände des Blattgewebes eindringt und nicht durch die Protoplasten der Epidermiszellen (Jordan, 1996).

Der Effekt der UV-B-Strahlung steht zusätzlich in Abhängigkeit von der Entwicklungsstufe des Gewebes (Jordan et al., 1994): dies zeigte sich am *cab*-Gen bei Erbsensämlingen - erst in reifen Geweben verursachte die UV-B-Exposition eine Reprimierung der Genexpression.

Wie bereits oben erwähnt, kann die DNA durch Absorption der UV-Strahlung geschädigt werden. Dies führt zur Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren und Pyrimidin-(6-4)-pyrimidon-Dimeren (Britt, 1996; Britt, 1999). Ebenso wurden DNA-Strang-Brüche, DNA-Protein-Vernetzungen und Singlet-Sauerstoffschäden beobachtet (Smith, 1977; Stapleton, 1992). Möglicherweise resultiert dies aus falschem Baseneinbau und aus Leserahmenverschiebungen der kodierenden Region während der Replikation (Jiang & Taylor, 1993). Zur Reparatur dieser Schäden verfügen die Pflanzen über drei verschiedene Mechanismen: Photoreaktivierung, Excisions- und Rekombinations-Reparatur (Smith, 1989; Kornberg & Baker, 1992; Sutherland et al., 1996). Die Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und Pyrimidin-(6-4)-pyrimidon-Dimere können durch alle drei Mechanismen repariert werden, die übrigen UV-induzierten Schäden nur durch Excisionen oder Rekombinationen. Die Photoreaktivierung erfolgt durch die Photolyase (Sancar, 1994; Sancar, 1996; Strid et al., 1994). Die Photolyase bindet spezifisch an Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und monomerisiert diese in Anwesenheit von Lichtenergie zwischen 370 und 450 nm (Pang & Hays, 1991; Britt, 1996; Sancar, 1996). Chen et al. (1994) zeigten, daß auch die Entfernung der Pyrimidin-(6-4)-pyrimidon-Dimere in einem lichtabhängigen Prozeß unabhängig von der Dunkelreparatur stattfindet. Dieses Ergebnis weist auf die Existenz zwei verschiedener Photolyasen hin (Jordan, 1996). Studien an *Arabidopsis* Photolyase Mutanten ergaben, daß die Cyclobutyl-Pyrimidin-Dimer-Photolyase für das Überleben der Pflanzen in Gegenwart von UV-B notwendig ist (Landry et al., 1997).

Ahmad et al. (1997) isolierten eine neue Photolyase ähnliche Sequenz aus *Arabidopsis*. Diese zeigte geringe Sequenzähnlichkeit zur Photolyase I oder zur Chryptochrom Familie des Blaulicht Photorezeptors und starke Homologien zur Photolyase II des prokaryotischen und des tierischen Systems. Die Expression dieses neu isolierten Photolyase Gens ist durch Licht induzierbar; dessen Expressionsprofil zur Photoreaktivierung der Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere ist dem bei Pflanzen sehr ähnlich.

Desweiteren ist bekannt, daß UV-B-Strahlung Superoxid-Radikale produziert (Green & Fluhr, 1995); diese könnten die Ursache für oxidative Schäden sein. Die Pflanzen entfernen diese Radikale über das antioxidative System. Das antioxidative System besteht aus niedermolekularen Antioxidantien, wie Glutathion, Ascorbat, α -Tocopherol und Carotenoiden (Alscher & Hess, 1993), und Enzymen, wie Superoxiddismutasen, Katalasen, Ascorbat-

Peroxidasen (Chen & Asada, 1989) und Glutathion-Reduktasen (Bowler et al., 1994; Creissen et al., 1994). Der Ascorbat/Glutathion-Zyklus ist in Pflanzen sowohl im Cytosol als auch im Chloroplasten lokalisiert (Strid et al., 1994; Willekens et al., 1994). Polyamine werden durch UV-B-Exposition induziert und wirken ebenso schützend, da sie die Lipidperoxidation reduzieren (Kramer et al., 1991). Möglicherweise bilden sie Konjugate mit den Hydroxyzimtsäuren und bieten so einen Schutz gegen die freien Radikale (Jordan, 1996).

2.3. Signaltransduktion und mögliche UV-B-Photorezeptoren

Die Absorption der UV-B-Strahlung bei Pflanzen erfolgt entweder gezielt über Photorezeptoren oder unspezifisch über Zellbestandteile (s. I.2.2.). Wird die UV-B-Strahlung über Photorezeptoren erfaßt, führt dies möglicherweise zur Adaption der Pflanze an die Strahlung. Die induzierte Signaltransduktion bewirkt die Weiterleitung der Botschaft an den richtigen Ort innerhalb der Zelle oder des Gewebes und löst eine spezifische Reaktion aus, wie z.B. die Induktion der Gene für die Synthese von Schutzpigmenten. Die beteiligten molekularen Mechanismen zur Übermittlung des Lichtsignals vom Rezeptor zum Zellmetabolismus wurden bisher noch wenig beschrieben. Es ist lediglich bekannt, daß die Übertragung des UV-B-Signals zum Zellstoffwechsel über Photorezeptoren erfolgt, was eine Änderung der Genexpression bewirkt (s. I.2.3.1.).

Um die verschiedenen Lichtqualitäten und -quantitäten der Umwelt zu erfassen, verfügen die Pflanzen über 3 verschiedene Photorezeptorsysteme: Phytochrom, Blaulicht-UV-A-Photorezeptor und einem spezifischen UV-B-Rezeptor (Schäfer et al., 1996; Kendrick et al., 1997). Ballare et al. lieferten bereits 1991 Hinweise über die Existenz eines spezifischen UV-B-Photorezeptors: UV-B-Untersuchungen an Wildtyp-Gurken-Pflanzen und Mutanten mit langem Hypokotyl (verfügen über wenig stabiles Phytochrom) zeigten gleich starke Wachstumshemmungen; folglich konnte es sich bei dem beteiligten Photorezeptor nicht um Phytochrom handeln.

Möglicherweise stehen die verschiedenen spezifischen Photorezeptoren über eine Signaltransduktionskaskade in Wechselwirkung (Kunkel et al., 1996). Anhand von Studien an *Arabidopsis* Zellkulturen belegte Jenkins (1997), daß eine Kombination von UV-B und Blaulicht-UV-A die induzierte Transkription des Chalkonsynthase-Gens verursacht. Eine Interaktion verschiedener Photorezeptoren nach UV-B-Exposition am Beispiel der Flavonoid-Biosynthese in Petersilien-Zellkulturen wurde in verschiedenen Arbeiten beschrieben (Bruns et al., 1986; Batschauer et al., 1991; Frohnmeier et al., 1992): die Induktion der Chalkonsynthase nach einer 2-stündigen lag-Phase; diese lag-Phase wurde durch eine Vorbehandlung der Zellen mit Blaulicht verhindert. Eine Exposition unter Rot/Dunkelrot-Licht veränderte das Ausmaß der Chalkonsynthase-Induktion.

Anhand von Genexpressionsstudien der Chalkonsynthase demonstrierten Schäfer et al. (1997), daß diese Expression primär unter der Kontrolle von Phytochrom A und dem Blaulicht-UV-Rezeptor steht. Als sehr frühe Prozesse der Phytochrom-Signaltransduktion konnten innerhalb weniger Sekunden nach Licht-Exposition Phosphorylierungen in Membran-entleerten Cytosol-Präparationen beobachtet werden (Schäfer et al., 1997). Die Expression eines spezifischen Gens kann während der Photomorphogenese sowohl induziert als auch reprimiert werden und die Wirksamkeit des Photorezeptors kann sich in Abhängigkeit von der Entwicklungsstufe ändern.

Die Charakterisierung des Phytochroms verfügt über mehr Details als die des Blaulicht-UV-A-Photorezeptors. Der Blaulicht-UV-A-Photorezeptor ist womöglich ein Flavin oder Flavoprotein (Short & Briggs, 1994); dieser wird in allen Pflanzengewebe exprimiert und könnte - ebenso wie das Phytochrom - ein lösliches Protein sein.

2.3.1. Mechanismen der Signaltransduktion

Wie bereits hinreichend aus tierischen Systemen bekannt ist, könnte auch bei Pflanzen die lichtabhängige Signaltransduktionskette mit einem sekundären Botenstoff, wie z.B. G-Protein, Ca^{2+} , cAMP und dem Inositol-Phosphat-Weg, gekoppelt sein. Die meisten Informationen über lichtinduzierte Transduktionswege existieren über Phytochrom (Roux, 1994), bei denen Änderungen der Permeabilität der Plasmamembran, G-Proteine und der Inositol-Phosphat-Weg involviert sind.

Mittels Protoplasten-Studien an heterotrophen Petersilien-Zellkulturen zeigten Frohnmeyer et al. (1997), daß sich die UV-B-vermittelte Expression der Chalkonsynthase und Phenylalanin-ammonium-lyase von dem Phytochrom-abhängigen Weg in Sojabohne und Tomate unterscheidet. Die UV-Licht induzierte Genexpression in Petersilie steht in Abhängigkeit von Calcium, Calmodulin und einer Serin/Threonin Proteinkinase Aktivität und ist dagegen völlig unabhängig von cyclischem Guanosinmonophosphat und Genistein. Logemann et al. (1995) belegten anhand von Zellsuspensions-Kulturen von Petersilie, daß ein Signalweg für die Aktivierung der Abwehr-abhängigen Genaktivierung und Zellzyklus-abhängigen Gen-reprimierung verantwortlich ist.

Im Gegensatz dazu erfolgt die Expression der Chalkonsynthase in Sojabohne und in Tomaten-Sämlingen durch Phytochrom A über ein heterotrimeres G-Protein, cyclisches Guanosinmonophosphat und eine Genistein-sensitive (Tyrosin) Proteinkinase (Schäfer et al., 1997).

Beim Zusammenfassen der Studien über die Expression der Chalkonsynthase wird deutlich, daß Pflanzenzellen verschiedene lichtabhängige Signaltransduktionswege nutzen können (Frohnmeyer et al., 1997).

Über die detaillierte Blaulicht-UV-A-Signaltransduktion durch Cryptochrom ist bisher ebenso wenig bekannt. Vermutlich ist das Cryptochrom 1 ein lösliches Protein und nicht membran-assoziiert. Trotzdem könnte das Cryptochrom mit der Membran interagieren, wodurch die Initiierung der Signaltransduktion erfolgen kann. Möglicherweise gibt es eine Wechselwirkung zwischen dem C-terminalen Ende und einer membranassoziierten Komponente. Bei dem Blaulicht-UV-A-Signaltransduktionsweg wurde eine GTPase-Aktivität in der Plasmamembran - isoliert aus etiolierten apikalen Erbsenknospen - beobachtet (Warpeha et al., 1991). Das Cryptochrom 1 weist bezüglich der Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zur mikrobiellen DNA Photolyase auf (Malhotra et al., 1995); beide unterscheiden sich aber durch die Abwesenheit eines spezifischen Restes, der für die Substraterkennung der Photolyase notwendig ist (Li & Sancar, 1990).

Das in *E. coli* und Insektenzellen *in vitro*-exprimierte Cryptochrom gibt einen Hinweis darauf, daß vermutlich auch bei Pflanzen Flavin- und Pterin-Chromophoren gebunden werden (Lin et al., 1995; Malhotra et al., 1995). Deshalb könnte der Elektronentransport ein Anfangsereignis bei der Cryptochrom 1 Signaltransduktion sein. Der Zusammenhang von Redoxaktivitäten und Blaulicht-induzierten Antworten wurde von Jenkins et al. (1995) in anderen Spezies beschrieben. Photobiologische Studien stärken die Vermutung, daß eine Interaktion des Rot/Dunkelrot-Licht-absorbierenden Photorezeptors Phytochrom mit dem Blaulicht-Photorezeptor in *Arabidopsis thaliana* existiert (Ahmad & Cashmore, 1997): die Aktivität des Cryptochrom 1 Photorezeptors kann sich ändern, wenn die Gehalte des aktiven Phytochroms durch Rot- und Dunkelrot-Lichtpulse im Anschluß an die Blaulicht-Behandlung manipuliert werden.

Christie & Jenkins (1996) zeigten anhand von Studien mit *Arabidopsis*-Zellkulturen und Fuglevand et al. (1996) an *Arabidopsis*-Mutanten, daß die UV-B- und Blaulicht-UV-A-vermittelten Lichttransduktionswege zur Regulation der Chalkonsynthese verschieden sind. Lediglich bei der Blaulicht-UV-A-Induktion der Chalkonsynthese-Expression ist der Cryptochrom 1 Photorezeptor involviert (Fuglevand et al., 1996). Die Exposition unter UV-A oder Blaulicht zusammen mit UV-B wirkt bezüglich der Induktion der Chalkonsynthese-Transkriptakkumulation synergistisch (Jenkins, 1998). Vermutlich sind bei der Signaltransduktion im Blaulicht Membranprozeße beteiligt. Jenkins et al. (1995) beschrieben die Verbindung Blaulicht-induzierter Membranpotentialschwankungen und Protonen-Flüsse mit Stomata-Öffnungen bei *Vicia faba* (Shimazaki et al., 1986) und pulvinalen Bewegungen bei *Phaseolus* (Nishizaki, 1994). Studien an *Arabidopsis* Zellkulturen ergaben, daß sowohl UV-B als auch Blaulicht-UV-A den Calcium Gehalt im Cytosol über spezifische Ca^{2+} -ATPasen regulieren (Long & Jenkins, 1998). Durch die Lichtaufnahme ist vermutlich eine Redoxaktivität der Plasmamembran bedingt, was eine kontrollierte Freisetzung des Calciums

aus dem intrazellulären Raum zur Folge hat; dieses entstandene Calcium-Signal ist für die Induktion der Chalkonsynthase-Expression notwendig.

In Petersilien Zellkulturen fand durch Blaulicht und zeitgleiches UV-Licht eine maximale Expression der Chalkonsynthase statt (Ohl et al., 1989). In reifen Blättern von *Sinapis alba* und Petersilienpflanzen wurde die Chalkonsynthase-Expression durch UV-B und Blaulicht-UV-A-Photorezeptoren übermittelt; im Gegensatz dazu erfolgte diese Expression bei im Dunkeln gewachsenen Sämlingen durch die Kontrolle des Phytochroms (Batschauer et al., 1991; Frohmeyer et al., 1992).

Es zeigte sich, daß spezifische DNA Sequenz-Elemente des Chalkonsynthase-Promotors für die UV- und Blaulicht-Regulation notwendig sind (Rocholl et al., 1994; Kaiser et al., 1995; Hartmann et al., 1998). Durch verschiedene Photorezeptoren ausgelöste Signaltransduktionsketten wurden über die identische lichtregulierte Promotorsequenz kontrolliert. Die Übermittlung des Signals erfolgte über aktivierte Transkriptionsfaktoren, die an diese Sequenzbereiche gebunden haben und so die lichtabhängig veränderte Genexpression steuerten (Kaiser et al., 1995; Feldbrügge et al., 1994; Hartmann et al., 1998).

2.4. UV-B-Effekte in Abhängigkeit von den allgemeinen Lichtbedingungen (Photosynthetic Active Radiation = PAR)

Der Einfluß der PAR-Intensität ist sehr bedeutend bei der Untersuchung von UV-B-Effekten unter natürlichen Tageslicht-Bedingungen.

Niedrige PAR-Intensitäten (400-700 nm) und relativ hohe UV-B-Strahlung haben schädigende Wirkungen, wie die Hemmung der Photosynthese, Dunkelrespiration und Transpiration, Änderungen in der Assimilatverteilung, Reduktion in der Biomasse und Pflanzenhöhe, Änderungen in der Pigmentverteilung und der stomatären Festigkeit (Teramura et al., 1980; Bornman & Teramura, 1993; Jordan, 1996). Niedrige sichtbare Lichtintensitäten steigern die Empfindlichkeit von Getreidepflanzen gegenüber UV-B (Teramura 1980a, 1980b; Cen & Bornman 1990).

Warner & Caldwell (1983) zeigten an Studien mit Sojabohne, daß eine Vorbehandlung mit hohen PAR-Intensitäten schützend vor einer anschließenden UV-B-Strahlung wirken kann; eine gleichzeitige Exposition unter hohen PAR-Intensitäten und UV-B verursachte jedoch eine Hemmung der Photosynthese. Auch Untersuchungen mit *Arabidopsis thaliana* belegten, daß eine Vorkultivierung unter hohen PAR-Intensitäten vor einer nachfolgenden UV-B-Exposition die Sensitivität der Pflanzen gegenüber UV-B reduziert (Berkelaar et al., 1996). Hohe PAR-Intensitäten verringerten ebenso die durch UV-B-bedingte Repression der Gene des Photosyntheseapparates (Jordan et al., 1992). In diesem Zusammenhang wiesen Kramer et al. (1992) infolge hoher PAR-Intensitäten einen Anstieg der Polyamine nach, welche bekanntlich schützende Effekte vor der UV-B-Strahlung zeigten (s.o.). Desweiteren

zeichneten sich Pflanzen - unter hohen PAR-Intensitäten angezogen – durch dickere Blätter und höhere Flavonoid-Gehalte im Vergleich zu unter niedrigen PAR-Intensitäten kultivierten Pflanzen aus (Tevini et al., 1991).

Das Ausmaß der durch UV-B-bedingten Abnahme von mRNA-Transkripten wurde durch hohe PAR-Intensitäten verringert (Jordan et al., 1992). Dies gab wiederum Hinweise auf die schützende Wirkung hoher PAR-Intensitäten gegenüber UV-B-vermittelten Änderungen auf Genexpressionsebene. Diese Schutzfunktion wurde auf mRNA-Ebene bereits nach wenigen Stunden deutlich, weshalb die Ursache dafür nicht in der Änderung der Blattmorphologie oder in der Pigmentzusammensetzung liegen konnte. Der Schutz gegenüber Veränderungen auf Genexpressionsebene kann nicht auf den Photoreperatur-Mechanismen beruhen, sondern muß infolge des Auslösens der Synthese von Antioxidantien und anderen Schutzmolekülen, z.B. den Polyaminen, gewährleistet sein (Kramer et al., 1992).

3. Ozon-Effekte auf Zell- und Genebene

Troposphärisches Ozon (bodennahes Ozon) stieg durch die industrielle Expansion während des 20. Jahrhunderts in städtischen aber auch in ländlichen Regionen stark an (Heath, 1994). In den 70-iger und 80-iger Jahren verzeichnete man jährlich einen Anstieg um 2% (Pope, 1993). Die Bildung des Ozons erfolgt unter Sonneneinstrahlung hauptsächlich aus Stickstoffoxiden und Sauerstoff (Aktinson, 1990): durch die lichtabhängige Spaltung von Stickstoffdioxid wird atomarer Sauerstoff gebildet. Dieser atomare Sauerstoff reagiert mit molekularem Sauerstoff zu Ozon. Zwischen Ozon und Stickstoffmonoxid entsteht ein lichtabhängiges Reaktionsgleichgewicht mit molekularem Sauerstoff und Stickstoffdioxid (Elstner, 1988). Durch das Vorhandensein bestimmter Kohlenwasserstoffe, die mit Stickstoffmonoxid zu Stickstoffdioxid reagieren, wird das Gleichgewicht in Richtung Ozon-Bildung verschoben.

Chameides et al. (1994) berichteten von einer Zunahme der troposphärischen Ozon-Konzentration; an sonnigen Sommertagen verzeichneten Kley et al. (1990) Ozon-Werte größer

100 ppb. Ozon gelangt über die Stomata ins Blattinnere (Kerstiens & Lenzian, 1989) und diffundiert innerhalb des Apoplasten; dort wird es aufgrund der hohen Reaktivität schnell zu Hydroxyl- und Superoxidanion-Radikalen, H_2O_2 und anderen reaktiven Sauerstoffspezies umgesetzt (Heath & Taylor, 1997). Diese müssen durch Radikalfänger innerhalb des Apoplasten detoxifiziert werden, da sonst eine Schädigung der Proteine und Lipide der Plasmamembran und Cytoplasma-Komponenten erfolgt. Ascorbat, Polyamine und Tocopherol können im Apoplasten und der Plasmamembran als Radikalfänger lokalisiert sein. Die semipermeable Plasmamembran ist die erste symplastische Zellkomponente, auf die das Ozon in der Zelle trifft. Ozon bewirkt durch Inaktivierung der membrangebundenen Enzyme,

ATPasen, den Verlust der Semipermeabilität der Membran und stört somit das ionische Gleichgewicht der Zelle (Heath, 1988; Heath & Castillo, 1988; Castillo & Heath, 1990). Diese Veränderungen spielen möglicherweise auch eine bedeutende Rolle bei der Streßadaption und bei der Streßabwehr (Städler & Ziegler, 1993; Tokarska-Schlattner et al., 1997).

Die Toleranz von Pflanzen gegenüber Ozon steht in direktem Zusammenhang mit der stomatären Leitfähigkeit in den Blättern (Langebartels et al., 1997): die Fichte hat eine niedrige stomatäre Leitfähigkeit, weshalb sie als Ozon-tolerant bezeichnet wird, die Kiefer gilt als Ozon-sensitiv und die Europäische Buche liegt dazwischen (Reich, 1987). Häufig beobachtete Effekte bei Pflanzen sind die Abnahme der Photosynthese, Blattschäden, reduziertes Sproß- und Wurzelwachstum und vorzeitige Seneszenz (Heath, 1994; Guderian et al., 1985). Ozon-sensiblere Pflanzen, wie die Buche, reagieren auf eine Ozon-Langzeitbehandlung indirekt mit einer Ethylensynthese, welche für die Seneszenz und somit für den Verlust von Blattpigmenten sowie verfrühtem Blattfall verantwortlich ist (Langebartels et al., 1991; Braun & Flückinger, 1995). Vorzeitiger Blattfall infolge Ozon-Exposition wurde auch bei der Pappel beschrieben (Kargiolaki et al., 1991).

Schlagnhaufer et al. (1995) wiesen in Kartoffelpflanzen nach Ozon-Exposition eine Induktion des Transkriptes der 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat-Synthase nach; dieses Enzym ist bei der Ethylensynthese involviert. In Zusammenhang mit der steigenden Ethylenemission wurde eine Abnahme der mRNA-Transkript Gehalte der großen und kleinen Untereinheit der 1,5-Biphosphat Carboxylase/Oxygenase in Kartoffelpflanzen belegt (Reddy et al., 1993). Das Ausmaß der Beeinträchtigung der kleinen Untereinheit des Enzyms war stärker als das der großen. Ebenso beruht die Reduktion des Sproß- und Wurzelwachstum auf der hemmenden Wirkung des Assimilattransportes durch Ozon (Smeulders et al., 1995).

Ozon-sensible Arten können durch eine wesentlich geringere oder eine zu spät auftretende Abwehrreaktion charakterisiert werden. Als Schutzstoffe akkumulieren Ozon-tolerante Pflanzen bei Ozon-Exposition innerhalb weniger Stunden oder Tage phenolische Inhaltsstoffe, Phytoalexine, Polyamine oder reduziertes Ascorbat und Glutathion (Wellburn & Wellburn, 1996; Rosemann et al., 1991, Langebartels et al., 1997). Ozon löst möglicherweise den Start der Ethylenbiosynthese aus und führt zur Akkumulation der lytischen Enzymaktivität sowie zu Zellwandveränderungen, begründet durch die Produktion und den Einbau von Kallose, Lignin und Extensin (Sandermann et al., 1989a, 1989b; Langebartels et al., 1990; Kangasjärvi et al., 1994, Sandermann 1996). Eine sehr frühe Antwort innerhalb der ersten Stunden ist die Induktion der Ethylenbiosynthese und der Aktivierung der frühen Ozon-induzierten Gene (Langebartels et al., 1991; Eckey-Kaltenbach et al., 1994a; Willekens et al., 1994).

Luwe (1996) beschrieb Ozon-Effekte bei der Buche im Hinblick auf die Antioxidantien: Er zeigte, daß die Konzentrationen an extrazellulärem Ascorbat und intrazellulären Glutathion

und Ascorbat in Buchenblättern typischen Saison bedingten Schwankungen unterlagen. Die Änderungen der Antioxidantien im Apo- und Symplasten von Buchenblättern wurden unterschiedlichen ambienten Ozon-Konzentrationen der Luft zugeordnet.

Zu den frühen Antworten nach Ozon-Behandlung zählt die Transkript-Akkumulation von PR-Proteinen in Tabak (Ernst et al., 1992; Thalmair et al., 1996), in Petersilie (Eckey-Kaltenbach et al., 1994 und 1997) und Fichte (Kärenlampi et al., 1994). Durch Studien an hybriden Pappeln konnte gezeigt werden, daß bei Ozon-toleranten Pflanzen durch Ozon-Behandlung die Transkriptlevel für Phenylalanin-ammonium-lyase, O-Methyltransferase, ein PR-Protein und ein durch Verwundung-induzierbares Gen gegenüber den Ozon-sensitiven Pflanzen signifikant erhöht war (Koch et al., 1998). Dies steht jedoch im Widerspruch zu Studien mit *Nicotiana tabacum* L. Kultivaren: nach Ozon-Exposition waren die PR-Spiegel bei Bel W3 (Ozon-sensitiv) Kultivaren und nicht bei cv. Bel B (Ozon-tolerant) Kultivaren erhöht (Ernst et al., 1992).

Ernst et al. (1996) belegten, daß die Ozon-bedingte mRNA-Akkumulation der β -1,3-Glukanase auf die Ozon-exponierte Gewebefläche beschränkt war, und daß Ozon nicht zu einer systemischen Induktion von β -1,3-Glukanasen führte. In *Arabidopsis thaliana* fand nach 3 h Ozon-Behandlung die Induktion der mRNA von Glutathion-S-Transferase, der Phenylalanin-ammonium-lyase (Sharma & Davis, 1994) und der cytosolischen Ascorbat-Peroxidase (Kubo et al., 1995) statt. Desweiteren beschrieben Conklin & Last (1995) bei *Arabidopsis* nach einer 30-minütigen Ozon-Exposition einen Anstieg der mRNA der Glutathion-S-Transferase. Zum ersten Mal belegten Eckey-Kaltenbach et al. (1997) anhand von Studien mit Petersilie die Induktion des Transkripts des kleinen Hitzeschock-Proteins nach Ozon-Behandlung.

Innerhalb einer 6-stündigen Ozon-Applikation erfolgte in Petersilie ein Nachweis der mRNA-Induktion von Genen des Phenylpropanstoffwechsels, wie der Phenylalanin-ammonium-lyase, der 4-Coumaroyl-CoA Ligase und der Chalkonsynthase – Enzyme der Flavonoid- und Isoflavonoid-Biosynthese - (Eckey-Kaltenbach et al., 1994).

Zu den später induzierbaren Genen, d.h. nach 12 h Ozon-Exposition, zählten bei Petersilie Peroxidasen und hydroxyprolinreichen Glycoproteine (Eckey-Kaltenbach et al., 1994). In *Arabidopsis* wurden die maximalen Gehalte der Transkripte einer neutralen Peroxidase und der Superoxiddismutase nach einer 12-stündigen Exposition unter Ozon gemessen (Sharma & Davis, 1994).

Die Ozon-Applikation bei *Arabidopsis* bewirkte einen Anstieg der mRNA der cytosolischen Cu-, Zn-Superoxiddismutase und der Ascorbat-Peroxidase und eine Abnahme der Transkripte der chloroplastischen Fe-Superoxiddismutase, der Glutathion-Reduktase sowie der Transkripte des Chlorophyll-a/b-bindenden Proteins und der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Conklin & Last, 1995). Eine gesteigerte

Aktivität verschiedener Enzyme – des Superoxiddismutase-Ascorbat-Gluthation-Zyklus, wie der Glutathion-Reduktase und Ascorbat-Peroxidase – belegten Rao et al. (1996) bei *Arabidopsis thaliana* nach Ozon-Exposition. Bei der Pappel wurde die Induktion der Synthese von Glutathion und ebenso eine erhöhte Aktivität der Superoxiddismutase gefunden (Gupta et al., 1991). In Tabak wurden infolge der Ozon-Begasung die Transkripte der Katalase 1 reprimiert, die Transkripte der Katalase 3 leicht und die der Katalase 2 sowie der Glutathion-Peroxidase stark induziert (Willekens et al., 1994).

Galliano et al. (1993) zeigten in der Fichte die Induktion des Transkriptes der Zimtalkoholdehydrogenase, einem Schlüsselenzym der Lignin-Biosynthese; auch in Nadeln von Kiefernkeimlingen wurde auf mRNA-Ebene eine Induktion der Zimtalkoholdehydrogenase und der Stilbensynthese nach Ozon-Begasung nachgewiesen (Zinser et al., 1998). Einen Ozon-bedingten Anstieg der mRNA von Extensin in Kiefern, Fichte und Buche belegten Schneiderbauer et al. (1995).

Der „Memory-Effekt“ nach Ozon-Behandlung wurde von Sandermann et al. (1990) und Langebartels et al. (1997) beschrieben: Nadelbäume bzw. Buchenblätter älterer Jahrgänge wiesen bereits am Ende der Expositionsperiode sichtbare Symptome auf. Nach dem Weiterkultivieren der Bäume unter Freilandbedingungen wurde bei der Buche ein beschleunigter Blattfall beobachtet und im nachfolgenden Jahr bei zusätzlicher Belastung mit saurem Nebel ein verzögerter Knospenaustrieb.

Übersichtsartikel über die biochemische und molekulare Wirkung von Ozon auf Pflanzen sind in den letzten Jahren erschienen (Kangasjärvi et al., 1994; Sandermann, 1996; Sandermann et al., 1997; Sandermann et al., 1998).

4. Kombinationseffekte nach UV-B- und Ozon-Behandlung

Der Einfluß erhöhter UV-B-Strahlung auf das natürliche Pflanzen-Ökosystem und deren Interaktion mit anderen Streßfaktoren, wie z.B. Ozon, ist von zunehmender ökologischer Bedeutung (Sullivan & Teramura, 1994; Ormrod et al., 1995). Es existieren verschiedene Hypothesen über die Wirkung gleichzeitiger oder wechselnder Exposition unter mehreren Streßfaktoren: additive, synergistische oder antagonistische Effekte (Ormrod et al., 1995; Teramura et al., 1990). Untersuchungen mit Tabak und Petunie zeigten, daß das Pollenschlauchwachstum im Vergleich zur Behandlung mit nur einem Stressor durch aufeinanderfolgende Exposition von UV-B und Ozon additiv gehemmt wurde (Feder & Shrier, 1990). Bei *Arabidopsis thaliana* L. hingegen bewirkte eine Ozon-Applikation vor oder nach einer UV-B-Behandlung keine Veränderung im Sinapat- und Flavonolgehalt (Ormrod et al., 1995). Kiefer und Fichte zeigten im Vergleich zu einer kombinierten Ozon- und UV-B-Behandlung nach alleiniger Ozon-Exposition stärkere Nadelschäden (Schnitzler et al., 1999). Möglicherweise

stimuliert eine geringe UV-B-Bestrahlung das antioxidative Verteidigungssystem, wodurch die Toleranz gegenüber anderen Umweltstressfaktoren erhöht wird (Polle, 1997).

Verschiedene Stressoren lösten in *Petroselinum crispum* L. identische zelluläre Antworten aus: UV-Licht stimulierte den Flavonglycosid-Weg und Pilz-Elicitoren den Furanocoumarin-Phytoalexin-Weg; Ozon hingegen induzierte simultan beide Wege (Eckey-Kaltenbach et al., 1994a). Verschiedene Streßfaktoren, wie Ozon und UV-B, lösen auch ähnliche antioxidative Antworten aus. Willekens et al. (1994) berichteten, daß eine Behandlung von UV-B oder Ozon bei *Nicotiana plumbaginifolia* L. induzierende Wirkungen auf mRNA-Ebene hatte: bei der chloroplastischen und cytosolischen Cu-, Zn-Superoxiddismutase, der cytosolischen Ascorbat-Peroxidase und der Katalase 3. Die Induktion der Glutathion-Peroxidase gilt als frühe Antwort von Pflanzen auf Ozon bzw. UV-B. Nach Ozon- bzw. UV-B-Exposition wurde die Aktivität von Cu-, Zn-Superoxiddismutase-Isoformen in *Arabidopsis thaliana* gesteigert (Rao et al., 1996). UV-B bzw. Ozon bewirkten die erhöhte Expression der Glutathion-Reduktase (Strid, 1993; Willekens et al., 1994), obwohl Edwards et al. (1994) in Erbse zeigten, daß Ozon allein keinen Effekt auf das Protein Glutathion-Reduktase ausübte.

Bei Behandlung von Tabak mit UV-B und Ozon blieb die Ozon-abhängige Induktion der β -1,3-Glukanase nahezu unverändert (Thalmair et al., 1996). In jungen Kieferkeimlingen hingegen führte die kombinierte UV-B- und Ozon-Exposition sowohl in den Kotyledonen als auch den Primärnadeln zu einer verstärkten Ozon-bedingten Akkumulation der Stilbensynthese-mRNA (Zinser et al., 1998). Zweifach ambiente Ozon-Konzentrationen zusammen mit niedrigen UV-B-Bestrahlungen reduzieren die Ozon-vermittelten Anstiege von Ascorbat und Katalase in Kiefer, aber nicht in Fichte (Baumbusch et al., 1998). Kiefernadeln, die unter UV-B und erhöhtem Ozon exponiert wurden, zeigten eine gesteigerte Lipidperoxidation und einen 5-fachen Anstieg des Dehydroascorbats; folglich ist die Kiefer im Vergleich zur Fichte weniger geschützt und dadurch einem höheren oxidativen Stress ausgesetzt (Baumbusch et al., 1998).

5. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, frühe Effekte nach UV-B-Exposition zu erfassen. Da Pflanzen gegenüber UV-B unterschiedlich empfindlich reagieren (s.o.), sollten zuerst Untersuchungen auf löslicher Gesamtproteinebene durchgeführt werden. Es war geplant, die aufgrund erhöhter UV-B-Exposition induzierten bzw. reprimierten Proteine mittels einer nachfolgenden Proteinsequenzierung zu identifizieren. Die Proteinmengen waren jedoch für eine Sequenzierung nicht ausreichend. Deshalb wurden anschließend Untersuchungen auf Transkriptionsebene durchgeführt, um die Frage zu klären, zu welchem Zeitpunkt frühe Effekte auf mRNA-Ebene nachweisbar sind. Somit sollten UV-B-Markergene isoliert werden, die möglicherweise weiterführend für ökodiagnostische Untersuchungen dienen könnten.

Es war geplant, die durch UV-B-induzierten Veränderungen auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den Kontrollpflanzen aufzuzeigen, die zugehörigen Gene zu klonieren und anschließend zu sequenzieren.

Diese UV-B-induzierten Gene sollten danach mittels Zeitkinetiken nach Behandlung mit erhöhtem UV-B im Vergleich zu Starklicht ohne UV-B charakterisiert werden. Dazu sollten einzelne Transkripte beispielhaft unter erhöhtem Ozon (300 ppb Ozon, 8 h) sowie erhöhtem Ozon kombiniert mit erhöhtem UV-B untersucht werden. Die Aufnahmerate des Ozons durch die Spaltöffnungen wird von verschiedenen Umgebungsparametern, wie Luftfeuchtigkeit, Windgeschwindigkeit und Lichtintensitäten (Fredericksen et al., 1996), beeinflusst. Bei einer Ozon-Behandlung mit mindestens 150 ppb wurden durch das Schadgas bei Kieferkeimlingen Effekte der Stilbensynthase-Aktivität sowie der Stilben-Akkumulation beobachtet (Rosemann et al., 1991). Kieferkeimlinge, die hingegen 8 h täglich unter 300 ppb Ozon und Starklicht exponiert wurden, zeigten eine transiente Induktion der Transkripte der Stilbensynthase und einen konstant hohen Transkriptgehalt der Zimtalkoholdehydrogenase (Zinser et al., 1998). Um bei diesem Screening möglichst alle differentiell exprimierten Transkripte bei der Buche zu erfassen, wurde bei den vorliegenden Experimenten eine Ozon-Behandlung von 300 ppb gewählt. In diesem Zusammenhang war es ebenso von Interesse, ob durch die Kombination zweier abiotischer Stressoren der Effekt der Induktion oder Repression beeinflusst wird.

Ausschlaggebend für den Schutz der Pflanze vor der UV-B-Strahlung ist auch die vorhandene PAR-Intensität. Aus diesem Grund erfolgte die Anzucht der Pflanzen bereits unter umweltähnlichen UV-B/PAR-Bedingungen. Die UV-B-Experimente wurden in der UV-Prototyp-Kammer (Seckmeyer & Payer, 1993) und dem Sonnensimulator durchgeführt. Das Lichtspektrum dieser Kammern simulierte das Sonnenlicht. Als Untersuchungsmaterial dienten die Primärblätter der 10-wöchigen Buchensämlingen, da man diese als Modellsystem für ältere Bäume einsetzen kann.

Nach Schütt et al. (1992) zählt die Rotbuche *Fagus sylvatica* L. zu der verbreitetsten Laubbaumart in Mitteleuropa; 20% der Waldfläche in Deutschland bestehen aus Buchenwäldern. Im Hinblick auf die sich ändernden Umweltbedingungen ist *Fagus sylvatica* L. von großer ökologischer Bedeutung. Es gibt bisher zwar einige Untersuchungen auf molekularer Ebene bezüglich erhöhter UV-B-Exposition an Coniferen – wie *Pinus sylvestris* L. Keimlingen (Zinser et al., 1998; Schnitzler et al., 1996) – jedoch nicht bei Laubbäumen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Chemikalien

Es wurden stets Chemikalien mit analytischen Reinheitsgrad (p.A.) von den Firmen Aldrich Chemie, Steinheim; Bio-Rad Laboratories, München; Calbiochem, Frankfurt; Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm; Merck, Darmstadt; Serva Feinchemikalien, Heidelberg, und Sigma Chemie, Deisenhofen verwendet.

Desweiteren stammten folgende Chemikalien von Sigma Chemie, Deisenhofen: Heringssperma-DNA, Bromphenolblau und Xylencyanolblau, Rinderserumalbumin (BSA), Diethylpyrocarbonat (DEPC), Polyvinylpyrrolidin (PVP), Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) und Dithiothreitol (DTT).

Die Nukleotidtriphosphate (dNTP) wurden von MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, oder Amersham Buchler, Braunschweig, bezogen. Die eingesetzten Farbstoffe Serva G Blau und Coomassie Brilliant Blue R 250 lieferte Serva.

Die Chemikalien für die 2-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) stammten von Bio-Rad Laboratories und Pharmacia, Freiburg.

Die Protogel-Lösung (30% Acrylamid (w/v), 0,8% Bisacrylamid (w/v), die Accugel-Lösung (40% (29:1) Acrylamid: Bisacrylamid-Lösung) und die Sequagel-Lösung XR Konzentrat wurden von National Diagnostics, Manville, New Jersey, USA, eingesetzt.

Die verwendeten Radiochemikalien wurden von Amersham Buchler bezogen: L-[³⁵S]-Methionin, Molekulargewichtsmarker [¹⁴C]-methylierte Proteinmischung (14,3/ 30/ 46/ 66/ 97,4/ 220 kDa), α -[³⁵S]-dATP (Adenosin 5'-[α -³²S]-Triphosphat), γ -[³²P]-dATP (Adenosin 5'-[γ -³²P]-Triphosphat und α -[³²P]-dCTP (Desoxycytidin 5'-[α -³²P]-Triphosphat).

1.2. Verwendete Puffer und Lösungen

Die Herstellung der Puffer, Lösungen und des deionisierten Formamides erfolgte nach Maniatis et al. (1982). Die Heringssperma-DNA (1 g auf 100 ml H₂O) wurde vor dem Zusatz zur Hybridisierungslösung 20 min bei 100°C inkubiert und danach 2x für je 10 min mit Ultraschall behandelt.

Für die RNA-Extraktion verwendete Lösungen wurden üblicherweise mit 0,1%-igen DEPC hergestellt und autoklaviert; enthielten die Lösungen Tris, so wurden diese bereits mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt und ein zweites Mal autoklaviert. Die Gelkammern und Quarzküvetten wurden vor Gebrauch über Nacht in 0,2 N NaOH-Lösung gelegt.

Die RNA- und DNA-Größenstandards wurden von Boehringer Mannheim, Mannheim; Appligene Oncor, Heidelberg, und MBI Fermentas GmbH bezogen.

<u>LB-Medium</u> (Luria Bertani-Medium): 10g/l Bacto-Trypton (Difco Laboratories, Detroit, USA), 5 g/l Hefeextrakt (Difco Laboratories), 10 g/l NaCl, pH 7,5.
<u>LB-Agar</u> : LB-Medium plus 15 g/l Bacto-Agar (Difco Laboratories)
<u>TE-Puffer</u> : 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA
<u>TBE-Puffer</u> : 90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA (pH 8,0)
<u>TAE-Puffer</u> : 40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA (pH 7,8)
<u>20 X SSC</u> : 3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat (pH 7,0)
<u>100 X Denhardt's Lösung</u> : je 2% (w:v) Ficoll, PVP, BSA
<u>Antibiotika-Stammlösungen</u> : 50 µg/ml Ampicillin (Amp)
<u>Farbstoffe für die Blau/Weiß-Selektion</u> : 0,1 M Isopropyl-/D-thiogalactopyranosid (IPTG), 50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranosid (X-Gal).

1.3. Enzyme

Restriktionsenzyme	Boehringer Mannheim
Enzyme für die PCR	Boehringer Mannheim und Perkin Elmer, Weiterstadt
T4-DNA-Ligase	Gibco BRL, Eggenstein
Reverse Transkriptase SuperScript II	Gibco BRL
Ribonuklease A (RNase A)	Gibco BRL
Ribonuklease H (RNase H)	Gibco BRL
Ribonukleaseinhibitor (RNasin)	Sigma
Desoxyribonuklease (DNase)	Sigma

1.4. Verbrauchsmaterialien

Filterpapier Whatman 3 MM	Whatman LTD, Maidstone
Frühstorfer Erde Typ T	Industrie Erde Werk, Lauterbach Wallenrod
Immobiline® Dry Strip (pH 3 - 10,5; 110 mm, 0,5 mm Dicke)	Pharmacia, Freiburg
Mikrotiterplatten	Bio-Rad, München
Membran Hybond N bzw. Hybond N ⁺	Amersham Buchler, Braunschweig
Perlit (Agriperl)	Dämmstoff GmbH & Co, Dortmund
Pflanzschalen	Emanuel, München
PhosphorImager Platten	Fuji, Japan
Rotiszint 11	Roth, Karlsruhe
Röntgenfilme Fuji RX 100	Fuji, Japan
TeKu-Pflanzcontainer	Emanuel, München
Wuxal-Düngerlösung	Schering AG, Berlin

1.5. Geräte

10-fach Vakuumsfiltrationsgerät mit Sammelbehälter	Schleicher & Schuell, Dassel
ELISA-Mikrotiterplatten-Lesegerät Thermo _{max}	MWG, Biotech, Ebersberg
Fuji Bas 1000 Scanner	Fuji, Japan
Geltrockner	Bachhofer, Reutlingen
LKB Horizontalelektrophorese Universalkammer	Pharmacia, Freiburg
Multiphor II, Netzgerät Macrodrive 5	
Modell S 2 Sequenzierungs-Gelelektrophorese Gerät	Gibco BRL, Eggenstein
Ozon-Analysator CSI 3100	Columbia Scientific Instruments, USA
Ozon-Generator 500	Fischer, Meckenheim
Scanner OmniMedia 6 CX	XRS, USA
UV-Crosslinker 1800	Stratagene, Heidelberg
Vertikale Elektrophoresekammer Protean II xi	Bio-Rad, München

1.6. Bestimmung der Radioaktivität durch Flüssigkeits-Szintillationszählung

Die Messung der Radioaktivität in den Proben erfolgte mit Hilfe der Szintillationszählung (LS 1801, Beckmann, München) in je 10 ml Rotiszint 11-Lösung. Als Blindwert diente die Rotiszint 11-Lösung ohne Probe.

1.7. Protokolle für die verwendeten Gele

1%-TBE-Agarosegel: 1 g Agarose auf 100 ml mit 1% (w/v) TBE auffüllen.

Polyacrylamidgel für die Proteine: 11%-iges Trenngel (11 ml Bisacrylamid 29,2 : 0,8; 7,4 ml Tris-HCl (1.5 M; pH 8.8); 0,3 ml 10% (w/v) SDS; 0,01 ml TEMED; 11 ml H₂O deionisiert; 0,2 ml 10 % APS) und 5%-iges Sammelgel (1,25 ml Bisacrylamid 29,2:0,8; 1,85 ml Tris-HCl (0.5 M; pH 6,8); 75 µl 10% (w/v) SDS; 2,5 µl TEMED; 4,2 ml H₂O deionisiert; 0,1 ml 10% (w/v) APS).

Polyacrylamidgel für die in-vitro translatierten Proteine: 12%-iges Trenngel (12 ml Bisacrylamid 29,2 : 0,8; 7,4 ml Tris-HCl (1.5 M; pH 8.8); 0,3 ml 10% (w/v) SDS; 0,01 ml TEMED; 10 ml H₂O deionisiert; 0,2 ml 10 % (w/v) APS und 5%-iges Sammelgel (1,25 ml Bisacrylamid 29,2:0,8; 1,85 ml Tris-HCl (0.5 M; pH 6,8); 75 µl 10% (w/v) SDS; 2,5 µl TEMED; 4,2 ml H₂O deionisiert; 0,1 ml 10% (w/v) APS).

6% natives Polyacrylamidgel für das Differentielle Display Reverse Transkriptase - Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR): 10 ml 10X TBE, 15 ml AccuGel (29:1, National Diagnostics); 75 ml H₂O; 20 µl TEMED; 1,0 ml 10% (w/v) APS.

6%-iges denaturierendes Sequenziergel mit Fluoreszenzmarkierung am ABI DNA Sequencer 373A (Perkin Elmer): 14,4 ml Konzentrat und 39,6 ml Verdünnungslösung des SequaGels® (National Diagnostics); 6 ml 10X TBE, 480 µl (10%; w/v) APS; 21 µl TEMED.

2. Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen der *Fagus sylvatica* L.-Keimlinge

Die Keimlingsanzucht der Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) aus der staatlichen Samenklengle in Laufen (Reifejahr 1992) wurde optimiert (Matthei, 1989).

Das Wässern der Samen erfolgte über Nacht unter fließendem Leitungswasser (Samen benötigen 32% Feuchtigkeit zum Keimen), die aufschwimmenden Samen (ca. 5%) wurden verworfen. Zum Ankeimen wurden die Samen in mit Perlit gefüllte Pflanzschalen ausgesät, mit destilliertem Wasser gegossen, mit Folie abgedeckt und für weitere 10 Tage bei 10°C bis zum Beginn der Samenkeimung kultiviert. Anschließend wurden die Schalen in eine Phyto-kammer (13 h Lichtperiode; Photosynthetic Active Radiation (PAR¹) $80 \pm 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Temperatur 15°C/ 10°C; Luftfeuchte ca. 60-85 %) gestellt, die Folie entfernt und die Samen weiterhin mit destilliertem Wasser gegossen. Die Keimblattanlagen waren nach ca. 10 - 14 Tagen sichtbar, von diesem Zeitpunkt an erfolgte die wöchentliche (über 2 Wochen) Düngung der Sämlinge mit je 600 ml einer verdünnten Wuxal-Lösung (30ml/10l Wasser, Schering AG) pro Anzuchtsschale. 14 Tage später - mit Ausbildung der 1. Blattetage - wurden die Buchensämlinge in Erde mit Langzeitdünger überführt (TeKu-Container), wobei die verwendete Erde mit Perlit (2:1) vermischt wurde.

Nach weiteren 14 Tagen wurden die Sämlinge für 10 Tage in der klimatisierten Phyto-kammer 6 (13 stündige Lichtperiode, 15 klux, PAR $184 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Temperatur 20°C/17°C; Luftfeuchte $70 \pm 5\%$; Rosemann et al., 1991) an andere Temperaturbedingungen adaptiert und legten währenddessen bereits neue Triebe an.

3. Behandlung der Sämlinge mit verschiedenen abiotischen Faktoren

3.1. UV-B Exposition der Buchensämlinge

3.1.1. Aufbau der UV-Prototyp-Kammer

Die Prototyp-Kammer (s. Abb. 2) lässt sich in einen Versuchs- und Lampenraum unterteilen. Diese beiden Bereiche sind durch Fensterglas- bzw. Sanalux- und/oder Tempaxscheiben voneinander getrennt. Da die verschiedenen Scheiben unterschiedliche Cut off-Wellenlängen im gemessenen Spektrum aufweisen, ergibt sich durch die jeweilige Scheiben-

¹ PAR: Photosynthetic Active Radiation

kombination eine physikalisch genau berechenbare UV-B-Exposition ausgedrückt in plant damage bzw. $UV-B_{BE}^2$ Einheiten. Mittels des pflanzlichen Wirkungsspektrums von Caldwell (1971) wurde die biologisch effektive UV-B-Strahlung ($UV-B_{BE}$) berechnet.

Verschiedene Scheibenkombinationen trennten den Versuchsraum der Prototyp-Kammer des Sonnensimulators (s. Abb. 2) vom Lampenraum ab. Die UV-C Strahlung konnte durch die UV-Filter-Scheiben (5 mm Tempax, 6 mm Sanalux; Schott, Mainz, Deutschland) ausgeschlossen werden. Die Messungen mittels des Bentham Doppel-Monochromator Spektroradiometers (Thiel et al., 1996) lieferten die Spektren im UV-Bereich; die Überprüfung während der Experimente erfolgte durch kontinuierliches Erheben der Meßdaten mittels des Robertson-Berger Meters (Biometer Modell 501, Solar light, USA).

Die UV-Strahlung wurde hauptsächlich im unteren Teil des Lampenraums erzeugt (100 Leuchtstoffröhren TL 12/40 W, Philips). Der darüber gelegene Wasserfilter, der sich aus 2 Schichten Tempax (je 6,5 mm) und einer 2 cm Schicht von destilliertem Wasser zusammensetzte, diente zur Absorption der Infrarot-Strahlung. Die 36 Metallhalogenidlampen (HQL 400 W, Typ Daylight, Osram) und die 32 Halogenglühlampen (Halo Star 500 W, Osram) im oberen Lampenbereich lieferten einen Großteil des sichtbaren Lichts. Zusätzlich waren an der Decke und an den Seitenwänden Reflektorbleche befestigt. Die Luftzirkulation und Kühlung im Versuchsraum gewährleisteten die Kühl-, Gebläseaggregate und seitliche Lüftungsschlitze.

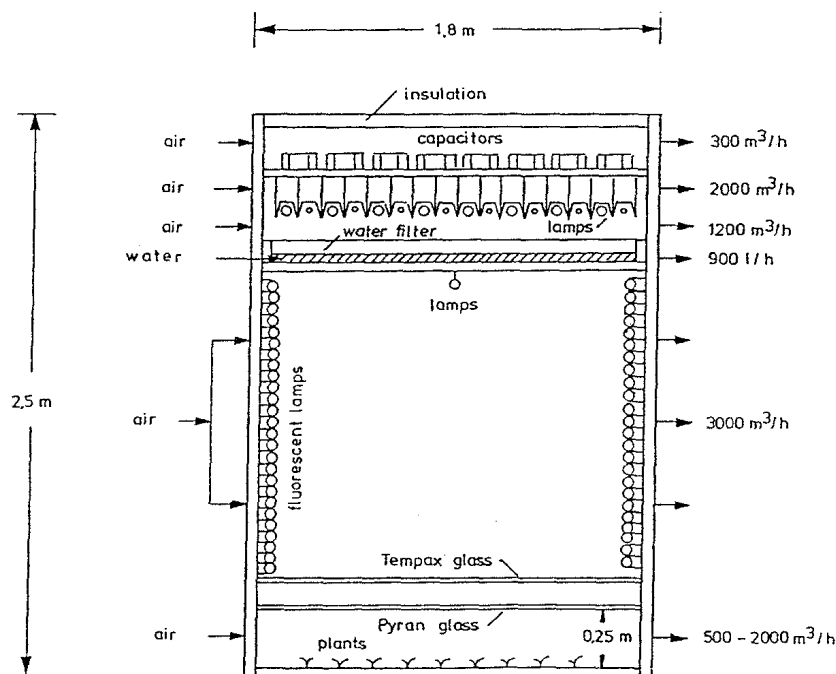


Abb.2: Schematischer Aufbau der UV-B-Prototypkammer (Seckmeyer & Payer, 1993).

² $UV-B_{BE}$: Biologisch effektive Bestrahlungsstärke nach Caldwell (1971), normalisiert bei 300 nm

3.1.2. Exposition der Buchensämlinge

Die Akklimation der ca. 8-wöchigen Sämlinge an die während des UV-B-Experimentes vorhandenen Starklicht-Bedingungen erfolgte anschließend für weitere 10 Tage in der UV-Prototyp-Kammer (GSF, Neuherberg; Seckmeyer & Payer, 1993). Die Pflanzen wurden im Prototyp des Sonnenlichtsimulators unter folgenden Bedingungen kultiviert: Temperatur: 17°C / 23°C, rel. Luftfeuchte: 70% \pm 15%, 14-stündige Lichtperiode (6 Uhr bis 20 Uhr MEZ) mit 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (400-700 nm) während der ersten und letzten 3 h und 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ von 9 bis 17 Uhr MEZ. Danach erfolgte eine 2-tägige, maximal 1-wöchige Exposition der Sämlinge unter UV-B-Strahlung. Die Pflanzen wurden täglich 6 h erhöhter UV-B-Strahlung (10 - 16 Uhr MEZ, UV-B_{BE} s. Tab. 2) ausgesetzt.

Tab. 2: Lichtbedingungen (PAR und UV-B_{BE}) während der Adaption und der anschließenden UV-B-Exposition am Beispiel von E 3 und E 4.

	Buchensämlinge (Alter)	Dauer der Phase	PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)			UV-B _{BE} (mW m^{-2})
Phase			I 3 h 6-9 Uhr	II 8 h 9- 17 Uhr	III 3 h 17-20 Uhr	IV 6 h 10-16 Uhr
Adaption	8 Wochen	10 Tage	500	1300	500	K<1
UV-B-Exposition	10 Wochen	2 Tage	500	1300	500	K<1 / UV-B _{BE} : 430

3.2. Ozon-Behandlung der Buchensämlinge

Die Ozon-Behandlung erfolgte ebenso wie die UV-B-Exposition in der UV-B-Prototyp-Kammer der GSF. Die Lichtbedingungen und Adaptationsbedingungen wurden bereits unter II.3.1.2. beschrieben. Um eine definierte Ozon-Behandlung zu gewährleisten, fand diese in UV-Licht durchlässigen Plexiglasküvetten (0,87 m x 0,52 m x 0,25 m) statt; die Pflanzen wurden während der Lichtperiode über 2 Tage jeweils 8 h täglich mit 300 ppb Ozon begast.

3.3. Durchgeführte Experimente

Für die Experimente im Prototyp wurden 10-wöchige Buchensämlinge eingesetzt, nach 10-tägiger Akklimation erfolgte die Behandlung über zwei bis drei Tage. Es wurde zu mehreren Zeitpunkten während des Experimentes geerntet. Die Versuchsbedingungen sind der Tab. 3 zu entnehmen.

Tab. 3: Sieben durchgeführte Experimente (E) mit den Versuchsnummern, Lichtstufen und UV-B_{BE}-Einheiten im Überblick.

E	Starklicht	Küvette 1	Küvette 2	Lichtstufen	UV-B _{BE} (mW m ⁻²)
1		Starklicht	UV-B	K < 1,3	720
3		Starklicht	UV-B	K < 1	430
4		Starklicht	UV-B	K < 1	430
5		Starklicht	Ozon		
7		Ozon	UV-B plus Ozon	K < 1	390
8	+	UV-B	UV-B plus Ozon	K < 1	(1): 360 / (2): 350
	Sonnensimulator				
9	± UV-B			K < 1	285

4. Ernte des Pflanzenmaterials

Die Blätter der ersten Blattetage der 10-wöchigen Buchensämlinge dienten als Material für alle durchgeführten Untersuchungen (s. Abb. 3).



Abb. 3: Buchensämlinge mit ausgebildeten Primärblättern zum Zeitpunkt der Ernte.

Zur Erstellung einer Kinetik erfolgte die Ernte der Primärblätter der Sämlinge zu verschiedenen Zeitpunkten während der unterschiedlichen Expositionen. Jeweils die ersten Blättertagen von mindestens 6 und höchstens 10 verschiedenen Pflanzen wurden für die jeweiligen Erntezeitpunkte bei den Experimenten 3, 4, 5, 7, 8 und 9 gemischt und bis zur Aufarbeitung bei (-80°C) gelagert. Lediglich bei E 1 setzte sich aufgrund des begrenzten Materials die Probe aus den 2 Primärblättern einer Buchenpflanze pro Erntezeitpunkt zusammen.

5. Extraktion des löslichen Gesamtproteins aus den Primärblättern der Buche (*Fagus sylvatica* L.)

Das Pflanzenmaterial aus E 1 wurde mittels eines Dismembrators 2 min unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme des homogenisierten Pflanzenmaterials (ca. 100 mg) in je 1 ml Borat-Extraktionspuffer (200 mM Borat/Borsäure pH 8,8; 2 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 1,5% PVPP; 5 mM DTT; 2 mM PMSF), wurde gemischt und die Probe 5 min bei 15 000 g, 4°C zentrifugiert. Der abgenommene Überstand wurde wiederholt unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert und anschließend das Volumen des Überstandes bestimmt.

5.1. Proteinbestimmung

Eine aliquote Menge des Überstandes diente für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) im Mikroassay. Die Bradford-Färbelösung bestand aus 25 mg Coomassie Brilliant Blue G 250, 20 Vol-% Ethanol und 10 Vol-% Phosphorsäure. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden je 10 µl drei verschiedener Konzentrationen (50 µg/ml; 100 µg/ml und 150 µg/ml) einer BSA-Lösung als Dreifachproben in einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Zu je 10 µl Probe (3 verschiedene Verdünnungen der Proben als Dreifachproben) und den Standards wurde je 200 µl Bradford-Lösung gegeben und 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Messung und Berechnung der Proteingehalte erfolgte im ELISA-Reader.

Diese Proteinbestimmung diente zur Abschätzung des Proteingehaltes in den Proben, da dieser zwischen 1,2 und 4,4 mg Protein/100 mg Frischgewicht liegen konnte.

5.2. Fällung des Proteins

Um die löslichen Proteine von anderen löslichen Komponenten wie Nukleinsäuren, Kohlenhydraten und niedermolekularen Verbindungen zu reinigen, wurde eine TCA-Fällung durchgeführt (Corbett et al., 1994; Görg et al., 1988a, 1988b).

Das Protein im Überstand wurde mit 1 Vol. 15%-iger (w/v) TCA-Lösung gefällt (1h, 4°C), abzentrifugiert (15 000 g, 4°C, 20 min) und das Pellet 2 mal mit je 2 ml 10% (w/v) TCA gewaschen (10 min, 4°C, 15 000 g). Vor der Aufbewahrung des Proteins bei (-80°C) wurde das Pellet getrocknet, um das restliche TCA zu beseitigen.

5.3. Verschiedene Protein-Extraktionspuffer im Vergleich

Es wurden verschiedene Extraktionspuffer getestet:

Sowohl mit dem 100 bzw. 200 mM HEPES-Puffer (pH 8,7 mit KOH) als auch mit dem 100 bzw. 200 mM Tris-Puffer (pH 8,6 mit HCl) war nur eine geringe Proteinextraktion von 16 bis 80 µg Protein/100 mg Frischgewicht möglich. Im Vergleich dazu konnte die Proteinextraktion mittels einer Boratpuffers bei optimalen Extraktionsbedingungen um bis zu 270-fach erhöhte Werte erzielen.

Wurde dem Borat-Puffer 100 mM CaCl_2 zugesetzt, konnte nur noch 10% des Gesamtproteins isoliert werden. Der Ersatz des unlöslichen durch lösliches PVPP während der Extraktion lieferte lediglich ca. 80% des Gesamtproteins.

6. 2D-PAGE des löslichen Gesamtproteins

Die Analyse der Änderungen auf Ebene der Proteinexpression hervorgerufen durch den Einfluß biologischer Faktoren gewinnt in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung und wird als „Proteomics“ bezeichnet (Anderson & Anderson, 1998; Celis et al., 1998, Santoni et al., 1998). Proteine sind die funktionellen Moleküle und deshalb die Komponenten, die qualitative und quantitative Unterschiede der Genexpression reflektieren. Das Schlagwort Proteomics faßt mehrere Techniken zusammen: Methoden der Auftrennung, Identifizierung, Quantifizierung und Charakterisierung der Proteine, aber ebenso auch Methoden zur Dokumentation, um Proteine mit DNA-Sequenzen und weiteren Informationen der Genom Projekte zu verbinden.

Die 2D-PAGE gilt als die beste Technik zur Identifizierung komplexer Proteingemische (O'Farrell, 1975). Die Kombination von Isofokussierung (IEF) mit der Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist relativ schnell und führt zu einer guten Trennung der Proteine. Aus diesem Grund wird die 2-dimensionale Gelelektrophorese häufig zur Identifizierung von Proteinen genutzt, deren Expression durch externe Stimuli oder entwicklungsphysiologisch verändert wurden (Hurkman & Tanaka, 1988; Ramagopal, 1989).

Es wurden verschiedene Methoden der 2D-Elektrophorese getestet:

Voraussetzung für reproduzierbares Arbeiten ist die Verwendung eines immobilisierten pH-Gradienten in der 1. Dimension der IEF. Beim Einsetzen der Ampholine PAG PLATES in der IEF beginnt der pH-Gradient zu driften, wodurch die Spotpositionen variieren und somit ein Teil der Proteine verloren geht.

Des Weiteren wurde die 2D-Elektrophorese mit Clean Gel 2D™ (ETC, Westermeier & Schickle GmbH) durchgeführt. Dieses Gel besitzt den Vorteil, daß beide Dimensionen und jeweils zwei Proben auf einem einzigen Gel aufgetrennt werden. Die 2D-Auftrennung der Proteine ist zudem innerhalb von 5 h abgeschlossen. Zur Auftrennung des Gesamtproteins

von Buchenblättern ist die Gelgröße (11 x 12,5 cm²/Probe) der Clean Gel 2D™ jedoch nicht ausreichend.

Aus diesem Grund wurde in der 1. Dimension der IEF ein immobilisierter pH-Gradient verwendet und die Auftrennung in der 2. Dimension erfolgte mittels eines SDS-Gels (0,75 mm Dicke, 20 x 22,3 cm² Fläche; 5% Sammelgel, 11% Trenngel).

6.1. Bestimmung des Protein-Verlustes durch die TCA-Fällung

Das gefällte Protein (s. II.5.2.) wurde anhand der vorhergehenden Proteinbestimmung in einer Konzentration von 4 mg/ml im IEF-Puffer (9 M Harnstoff, 2% Mercaptoethanol, 2% Pharmalyte 3-10 (Bio-Rad), 0,5% Nonidet-P-40) aufgenommen.

Um den Proteinverlust durch die TCA-Fällung (s. II.5.2.) zu berücksichtigen, erfolgte eine zweite Proteinbestimmung im IEF-Puffer nach dem modifizierten Bradford-Assay (Ramagli & Rodriguez, 1985; s. Abb. 4).

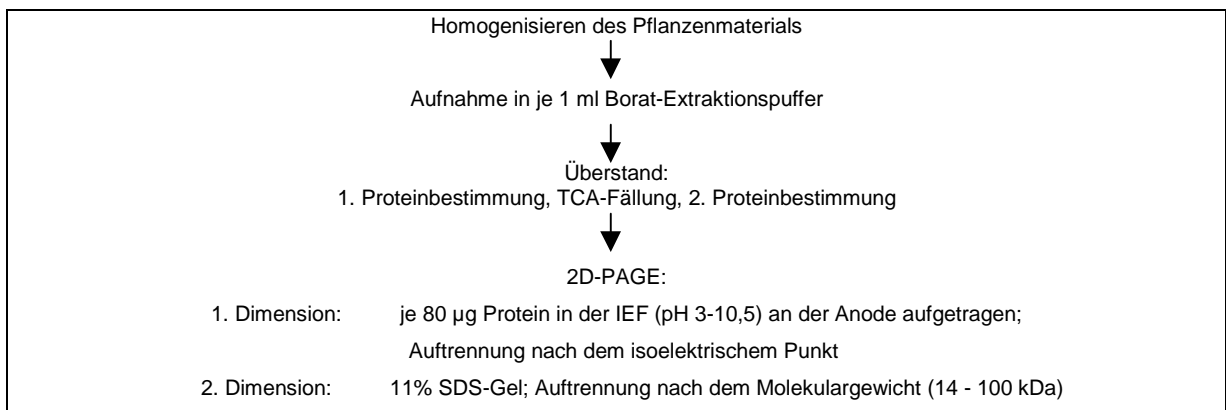


Abb. 4: Überblick über die eingesetzten Methoden einschließlich der 2D-PAGE der löslichen Gesamtproteine.

6.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Ausgehend von dieser Proteinbestimmung wurden stets 80 µg Protein an der anodischen Seite des IEF-Gels (Immobiline Dry Strip: 0,5 mm Dicke, 110 mm Länge; pH 3-10,5; Pharmacia) aufgetragen (Durchführung: Westermeier, 1990). Nach der Isofokussierung (1 h: 300 V, 1 mA, 5 W / 14-15 h: 1400 V, 1 mA, 5 W) wurde das IEF-Gel in 2 Schritten äquilibriert (Äquilibrationpuffer: 2% SDS, 6 M Harnstoff, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 30% Glycerin):

1. Schritt, 15 min: 10 ml Äquilibrationpuffer plus 100 mg DTT;
2. Schritt, 10 min: 10 ml Äquilibrationpuffer plus 100 mg DTT, 450 mg (5% w/v) Jodoacetamid und etwas Bromphenolblau. Es ist notwendig, Jodoacetamid dem 2. Schritt zuzusetzen, um so überschüssiges DTT zu entfernen (Görg et al., 1995); zu viel DTT verursacht in Gelen nach Silberfärbung „Streifen“ (Görg et al., 1988b).

Danach erfolgte entweder eine Auftrennung der Proteine auf dem IEF-Streifen in der 2. Dimension oder eine Lagerung der IEF-Streifen bei (-80°C).

6.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese in der 2. Dimension fand horizontal durch Auflegen des IEF-Streifens an der kathodischen Seite auf das SDS-Gel (0,75 mm Dicke, 20 x 22,3 cm² Fläche; 5% Sammelgel, 11% Trenngel) statt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 1 h bei 30 mA und anschließend für 2,5 h bei 35 mA in dem SDS-Elektrodenpuffer (190 mM Glycin, 26 mM Tris, 3 mM SDS). Das Auftragen von je 10 µl des Protein-Standardgemisches in der 2. Dimension ermöglichte die Größenbestimmung (kDa).

6.3.1. Färbung der Proteingele

Die Gele wurden der sensitiveren Silberfärbung unterzogen; diese erfolgte modifiziert nach Blum et al. (1987, s. Abb. 5):

1. Fixieren	50% MeOH, 12% HAc, 0.5 ml 37% HCOH/l	> 1 h
2. Waschen	50% Ethanol	3 x 20 min
3. Vorbehandeln	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O (0.2 g/l)	1 min
4. Waschen	H ₂ O	3 x 20 s
5. Imprägnieren	AgNO ₃ (2g/l), 0.75 ml 37% HCOH/l	20 min
6. Waschen	H ₂ O	2 x 20 s
7. Entwickeln	Na ₂ CO ₃ (60g/l), 0.5 ml 37% HCOH/l, Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O (4 mg/l)	30 s
8. Stoppen	kristalline Zitronensäure	
9. Waschen	50% MeOH	> 20 min

Abb. 5: Silberfärbung der Polyacrylamid-Gele modifiziert nach Blum et al. (1987).

Danach wurden die Gele je 30 min in 30% MeOH und in 3% Glycerol bei 4°C, 100 rpm geschüttelt. Das Trocknen der Gele erfolgte unter Vakuum zwischen 2 Cellophan-Blättern für 60 min bei 60°C.

6.3.2. Auswertung der Gele

Nach der Silberfärbung wurden die Gele eingescannt (XRS, USA). Die Quantifizierung der Proteinspots erfolgte mit der Software Tina, Version 9.0 von Raytest (Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt). Als interner Standard zur Berechnung diente die 66 kDa-Bande des aufgetragenen Protein-Standardgemisches.

7. RNA-Extraktion

Die RNA-Isolierung aus den Buchenblättern war sowohl mit der Methode nach Großkopf et al. (1994) als auch nach der Methode von Chang et al. (1993) erfolgreich.

Da die beiden RNA-Isolierungsmethoden qualitativ vergleichbar waren, wurde die kostengünstigere Methode nach Chang et al. (1993) gewählt. Zur Erhöhung der RNA-Ausbeute wurden dem Extraktionspuffer 4% unlösliches PVPP und 4% β -Mercaptoethanol - anstelle von jeweils 2% - zugesetzt. Je 1 g Blattmaterial diente als Ausgangsmaterial für die RNA-Isolierung.

7.1. Isolierung der poly (A)⁺-RNA

Die Isolierung der poly (A)⁺-RNA erfolgte mit Hilfe des PolyAtract mRNA-Isolationssystems IV (Promega Corp., Madison, USA) entsprechend den Angaben des Firmenprotokolls unter Berücksichtigung der Veränderungen nach Großkopf et al. (1994). Die Quantifizierung der poly (A)⁺-RNA wurde photometrisch bei 260 nm Wellenlänge durchgeführt. Auf einem 1%-igen TBE-Agarosegel fand die Überprüfung der RNA-Qualität statt. Die poly (A)⁺-RNA wurde über Nacht bei (-20°C) in Ethanol gefällt und anschließend in einer Konzentration von 1,5 µg/5µl aufgenommen. Diese wurde bei (-80°C) gelagert.

7.2. In vitro Translation

Das Pflanzenmaterial aus E 3 und E 4 wurde sowohl in die *in vitro* Translation als auch in die DDRT-PCR eingesetzt.

Die *in vitro* Translation erfolgte mit L-[³⁵S]-Methionin in einem Rabbit Reticulocytenlysats minus Methionin (Amersham). Nach Zugabe von jeweils 1,5 µg poly (A)⁺-RNA zum Translationsmix wurde die Translation 90 min bei 30°C durchgeführt. Eine optimale Translation zeigte sich durch eine Endkonzentration von 187,5 mM KAc und 2,35 mM Mg²⁺Ac im Reticulocytenlysats.

8. 2D-PAGE der *in vitro* translatierten Proteine

Die isolierte RNA stammte aus den Starklicht-exponierten (ohne UV-B) und aus Starklicht plus UV-B-behandelten Buchenblättern, um so über *in vitro* Translation (s. Abb. 6) den frühesten Zeitpunkt mit ausgeprägten Veränderungen im poly (A)⁺-Muster zu ermitteln.

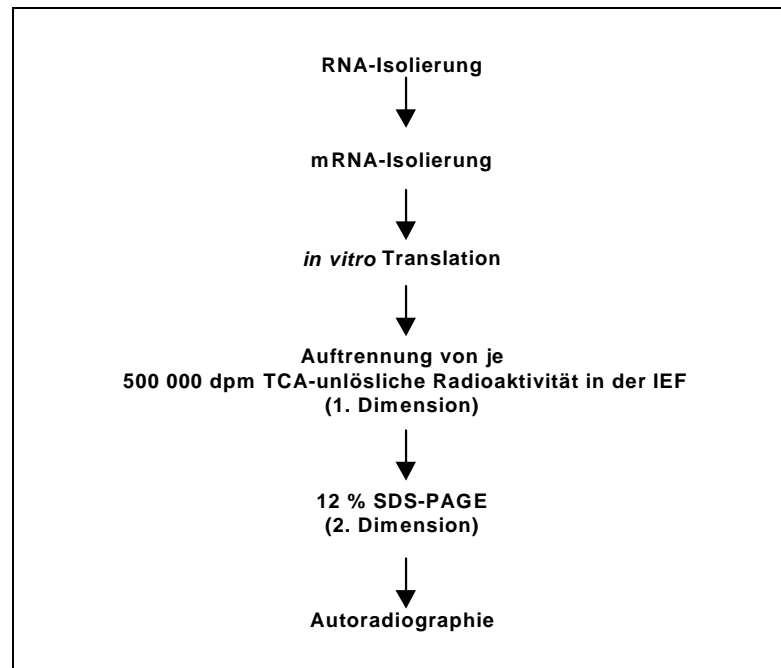


Abb. 6: Überblick über die eingesetzten Methoden einschließlich der 2D-PAGE der *in vitro* translatierten Proteine.

8.1. Isoelektrische Fokussierung (IEF) der *in vitro* translatierten Proteine

Die Auftrennung in der 1. Dimension erfolgte mit der IEF in einem immobilisierten pH-Gradienten (Immobiline Dry Strip Gele, Pharmacia). Jeweils 500 000 dpm TCA-unlösliche Radioaktivität der *in vitro* Translationsprobe, versetzt mit ca. 40 µl des IEF-Puffers (Pharmacia-Protokoll), wurde auf die 1. Dimension aufgetragen.

Die Durchführung der IEF fand horizontal in der LKB-Elektrophorese-Kammer entsprechend den Angaben von Pharmacia statt.

8.2. SDS-Gelelektrophorese der *in vitro* translatierten Proteine

Die Auftrennung in der 2. Dimension erfolgte vertikal (Bio-Rad) durch Anlegen des IEF-Streifens an der kathodischen Seite des Sodium-dodecyl-sulfat (SDS)-Geles (0,75 mm Dicke, 16 x 19 cm² Fläche; 5% Sammelgel, 12% Trenngel). Der IEF-Streifen wurde mit einer 1%-igen Agaroselösung (0.13 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 12.5% Glycerin, 1% Agarose, 50 mM DTT, Bromphenolblau) fixiert. Die Auftrennung der translatierten Proteine in der SDS-PAGE fand unter folgenden Bedingungen statt: 15°C, 15 mA. Das zusätzliche Auftragen eines ¹⁴C-Proteinstandardgemisches (Amersham) in der zweiten Dimension ermöglichte die Molekulargewichtszuordnung der Proteine.

Nach dem Lauf erfolgte das Fixieren der Gele in einer 10%-igen Essigsäure entweder 1 h oder über Nacht bei RT. Anschließend wurden die Gele 15 min in H₂O gewaschen und 2 h

unter Vakuum bei 60°C getrocknet. Die getrockneten Gele wurden zur Autoradiographie 48 h auf Phosphorimager-Platten (Fuji) aufgelegt. Nach dem Scannen der Platten mit Hilfe des Phosphorimagers erfolgte die Auswertung der 2D-Gele mit der Raytest-Software.

9. Differential Display RT-PCR (DDRT-PCR)

Mittels der DDRT-PCR (Liang & Pardee, 1992) können die durch verschiedene Stressoren bedingten Veränderungen auf Transkriptionsebene erfaßt werden. Diese Methode gilt als Alternative zum subtraktiven Screenen, welches wesentlich zeitaufwendiger ist.

Ziel war es, die durch UV-B-induzierten bzw. -reprimierten Veränderungen auf mRNA-Ebene zu beschreiben, diese Gene zu klonieren und anschließend zu sequenzieren.

Dazu wurde die isolierte RNA nach 3- und 6-stündiger UV-B-Behandlung (s. II.7.) gemischt und im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontroll-RNA eingesetzt. Die in eine cDNA umgeschriebene RNA diente als Ausgangsmaterial für DDRT-PCR.

9.1. Einzelstrang-cDNA-Synthese (ss-cDNA-Synthese)

9.1.1. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus den Buchenblättern der ersten Blattetage (Mischproben s. II.4.) erfolgte nach Großkopf et al. (1994). RNA, isoliert nach 3 und 6 h erhöhter UV-B-Behandlung ($UV-B_{BE}$ 430 $mW\ m^{-2}$, PAR 1300 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$), wurde vereint und im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontroll-RNA ($UV-B_{BE} < 0.5\ mW\ m^{-2}$, PAR 1300 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) in das Differentielle Display eingesetzt (s. II.9.2.2.).

9.1.2. Größenbestimmung der Einzelstrang-cDNA

Für die cDNA-Synthese konnte die RNA sowohl nach Großkopf et al. (1994) als auch nach Chang et al. (1993) isoliert werden. Die Erststrang-cDNA-Synthese wurde nach dem Firmenprotokoll (Gibco BRL) mit dem Enzym SuperScript II durchgeführt. Für die Größenbestimmung der cDNA erfolgte während der Synthese eine Markierung mit je 1 μl α -[^{32}P] dCTP (1 $\mu Ci/\mu l$) (Amersham). Dazu wurden 1 μg RNA auf 12 μl mit DEPC-behandeltem Wasser aufgefüllt, 1 μl 10 μM AP-Primer zugegeben und bei 65°C für 10 min denaturiert. Nachdem die Reaktion für 2 min auf Eis abgekühlt worden war, wurden 2 μl 10X Synthese-Puffer, 1 μl 10 mM dNTP-Mix, 2 μl 0,1 M DTT und 1 μl α -[^{32}P] dCTP (1 $\mu Ci/\mu l$) hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde vor Zugabe von 1 μl SuperScript Reverse Transkriptase 2 min bei 42°C äquilibriert und dann für 30 min bei 42°C weiter inkubiert. Die Extraktion der cDNA fand mit gleichem Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) unter Zentrifugation bei 13 500 g für 10 min bei 4°C statt. Die Fällung der cDNA erfolgte über Nacht bei (-20°C) mit 2 Vol. Ethanol und 0,5 Vol. Ammonium-Acetat. Danach wurde die cDNA in 20 μl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf dem 1%-igen mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel zusammen mit einem Größenmarker (Boehringer

Mannheim). Nach diesem Protokoll lieferte die cDNA-Synthese Produkte in der Größe von ca. 1,5 kb.

9.2. Die Methode des Differentiellen Displays (DDRT-PCR)

Die PCR der cDNAs wurde mit einem degenerierten Upstream-10-mer-Primer nach dem Hersteller-Protokoll durchgeführt. Die Markierung erfolgte anstelle von α -[32 P]-dATP mit L-[35 S]-dATP (1000 Ci/mmol, Amersham), und die PCR-Bedingungen wurden variiert: Schmelzzeit, Anlagerungs-Temperatur, Verlängerungszeit. Song et al. (1995) diskutierten, daß Upstream-Primer mit einem Glutamin-, Leucin- oder Serin-Codon am 3'-Ende erfolgreicher in die DDRT-PCR eingesetzt wurden, da diese Aminosäuren sehr häufig in Pflanzen vorkommen.

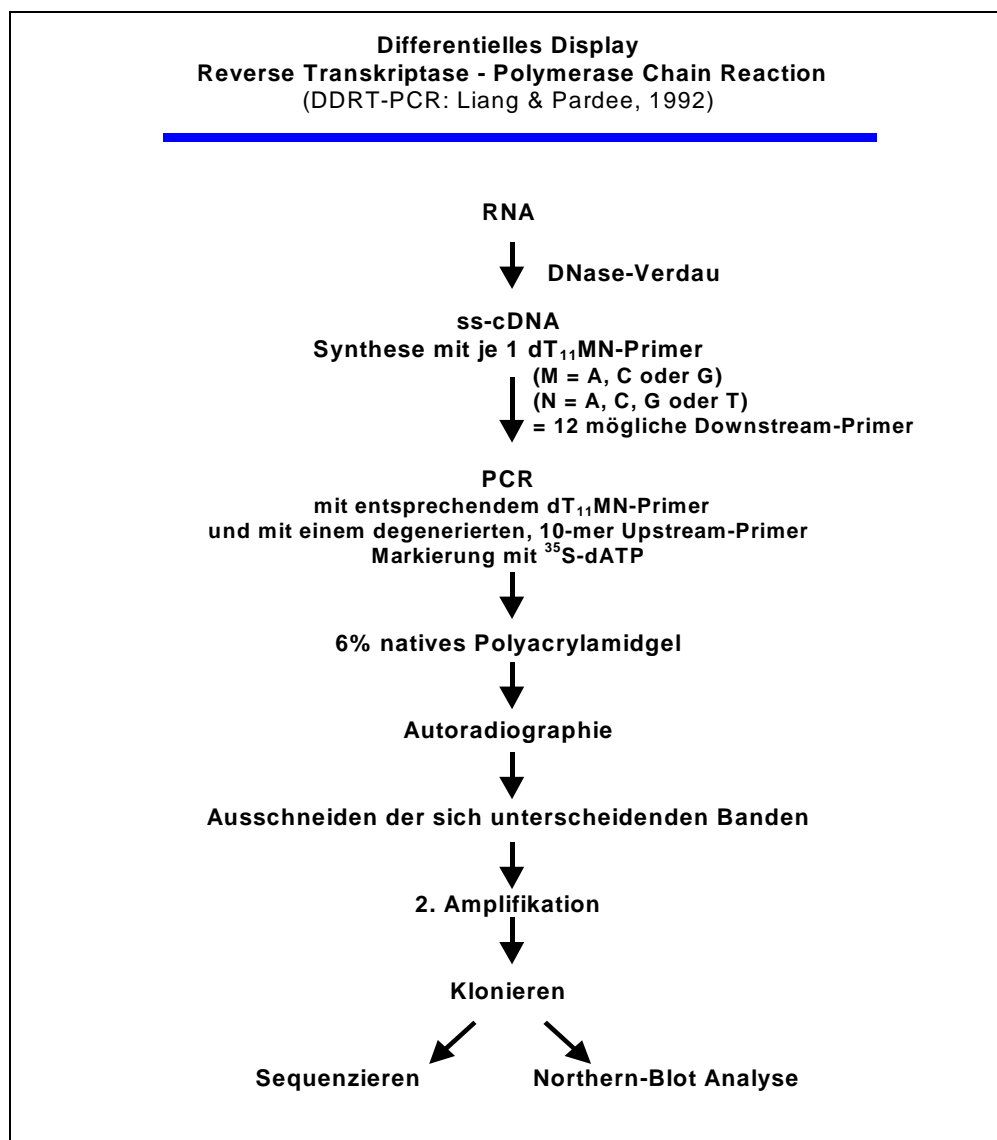


Abb. 7: Überblick über die Methode des Differentiellen Displays RT-PCR nach Liang & Pardee (1992).

Die von Bauer et al. (1993) vorgeschlagenen Downstream- und Upstream-Primer wurden für die DDRT-PCR verwendet (s. II.9.2.2.). Die Synthese der ss-cDNA fand mit 12 verschiedenen Downstream-Primern (5'-T₁₁XY-3') statt, wodurch eine Unterteilung der mRNA in 12 verschiedene Subpopulationen resultierte. Diese wurden jeweils einzeln in die anschließende PCR mit variierten degenerierten 10-mer Upstream-Primern eingesetzt (s. Abb. 7). Zusätzlich erfolgte die Durchführung der DDRT-PCR mit den von Song et al. (1995) diskutierten Upstream-Primern (Glutamin-, Leucin- oder Serin-Codon am 3'-Ende) und den von Oh et al. (1995) bei Pflanzen erfolgreich angewandten Upstream-Primern (s. Abb. 20, III.3.1.).

Die DDRT-PCR wurde mit Kontrollproben in einem Vergleich mit den UV-B-behandelten Proben durchgeführt, so daß die sich unterscheidenden Gene analysiert werden konnten. Diese cDNA-Fragmente wurden dann kloniert und sequenziert.

9.2.2. cDNA-Synthese und Differentielles Display

Gesamt-RNA (0,2 µg) wurde mit verschiedenen dT₁₁MN-Primern (Bauer et al., 1993) nach Angaben des Herstellers mit der Reversen Transkriptase Superscript II (Gibco BRL) in cDNA umgeschrieben. Je 0,5 µl des entsprechenden cDNA-Ansatzes wurden in eine PCR-Reaktion mit 2,5 µM dT₁₁MN-Primer, 0,5 µM Upstream-Primer, 10 µM dNTP, 0,5 µl α-[³⁵S]-dATP (1000 Ci/mmol), 1,5 mM MgCl₂, 0,1 Vol. 10X ExpandTM High Fidelity-Puffer und 0,5 U ExpandTM High Fidelity PCR System eingesetzt. Die Amplifizierung erfolgte unter folgenden Bedingungen: 40 Zyklen bei 94°C für 30 s, 40°C für 1 min, 72°C für 1 min und einer abschließenden Verlängerungszeit bei 72°C für 15 min. Nach der Amplifikation wurden die Proben im Vakuum auf ca. 5 µl eingeengt und mit 1 Vol. Loading-Puffer (50% Glycerin, 50% 1x TE pH 8,0, 0,1% Bromphenolblau, Xylencyanolblau) versetzt. Die Auftrennung der Probe fand auf einem 6%-igen, nativen Polyacrylamid-Gel (d=0,04 cm) für ca. 3-4 h bei 50 W statt (die Xylencyanolbande hatte zu diesem Zeitpunkt das Gel passiert). Danach erfolgte eine Autoradiographie über mindestens 48 h.

Die differentiellen Banden der Kontrolle bzw. der UV-B-Behandlung wurden aus dem Gel ausgeschnitten, rehydratisiert, kurze Zeit auf 100°C erhitzt und anschließend abzentrifugiert. Vom Überstand wurde 1 µl pro Probe für die 2. Amplifikation eingesetzt. Durch eine Erhöhung des Volumens des Templates in der zweiten PCR ergab sich keine höhere Ausbeute des Amplifikates. Die PCR-Bedingungen waren identisch mit denen in der 1. PCR-Runde.

Der gesamte PCR-Ansatz wurde anschließend zur Kontrolle auf einem 2%-igen Agarosegel (TAE) aufgetrennt (120 V; 1,5 h). Hier erfolgte zum ersten Mal eine Größenbestimmung der differentiellen Amplifikate mit Hilfe eines DNA-Längenstandards. Nur die PCR-Produkte, die größer als 200 bp waren, wurden aus dem Gel ausgeschnitten. Das Eluieren des PCR-

Produktes aus dem Gel fand durch Verwenden von Glasmilch statt (s. Jetsorb-Protokoll, Genomed).

Die PCR-Produkte wurden anschließend kloniert und sequenziert.

10. Klonierung der differentiellen UV-B-Amplifikate

Es wurden sowohl in einem TBE-Gel als auch TAE-Gel aufgetrennte PCR-Amplifikate kloniert. Es zeigte sich, daß PCR-Amplifikate, die in einem TAE-Gel aufgetrennt wurden, erfolgreicher kloniert werden konnten.

Die Klonierung der UV-B-induzierten bzw. -reprimierten PCR-Amplifikate fand entsprechend dem Firmen-Protokoll (Promega Corp.) in einem pGEM T-Vektor statt. Die Transformation erfolgte mittels kompetenter *E. coli* Zellen JM 109.

Jeweils 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf Agarplatten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal über Nacht bei 37°C inkubiert. Die erfolgreiche Transformation der Klone wurde durch eine Blau/Weiß-Selektion kontrolliert.

11. Transformationskontrolle mittels Kolonien-PCR

Eine schnelle Kontrolle, ob die weißen Kolonien des Transformationsansatzes das gewünschte Insert enthielten, gewährleistete die Anwendung der Methode der Kolonien-PCR:

Von der in sterilem Wasser (15 µl) aufgenommenen Kolonie wurde 1 µl auf Agarplatten weiterkultiviert, die restliche Suspension zur Lyse 5 min auf 100°C erhitzt und danach kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde in die PCR unter folgenden Bedingungen eingesetzt: 0,5 µM dNTP, je 1 µM Downstream- und Upstream-Primer (bzw. Forward- und Reverse-Primer des Vektors), 0,1 Vol. 10X Puffer, 1,25 U Taq-Polymerase. Das Abschätzen einer erfolgreichen Klonierung erfolgte im Anschluß an die PCR durch Auftrennen der dann vorhandenen PCR-Amplifikate auf einem 1%-igen TBE-Gel mit Hilfe eines Größenstandards.

Von den positiven Klonen wurde stets eine Übernacht-Kultur und eine Glycerin-Stammkultur angelegt.

12. Isolierung der Plasmid-DNA

Aus 200 ml Übernacht-Kultur wurde die Plasmid-DNA isoliert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den Klonen wurde mittels einer Midi-Präparation entsprechend dem Qiagen-Protokoll durchgeführt.

13. Sequenzieren der UV-Buchenklone

Die Sequenzierung erfolgte nach Sanger et al. (1977) sowohl automatisch als auch manuell. Beim automatischen Sequenzieren wurden gegenüber dem manuellen mehr Sequenz-

reaktionen in kurzer Zeit durchgeführt, wodurch schneller erste Informationen über die unbekannten Sequenzen vorlagen. Die Sequenzen der Buchen-Klone (Plasmid-DNA) wurden durch wiederholtes Sequenzieren (sowohl automatisch als auch manuell) bestätigt.

1. Das automatische Sequenzieren wurde am ABI-Sequencer in der AG BIODV (GSF, Neuherberg) mit Hilfe des ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Fluoreszenzmarkierung der Farb-Terminatoren. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurde ein Vorlauf des Gels für 1 h bei 1200 V; 23 mA; 28 W bei RT durchgeführt; die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte über 14 h unter den gleichen Bedingungen wie im Vorlauf.

2. Das manuelle Sequenzieren wurde freundlicherweise von Frau Kiefer in unserem Labor durchgeführt:

zuerst mit einer L-[³⁵S]-Markierung im T 7 Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (Amersham Buchler, s. Firmenprotokoll im Anhang) und später mit dem „Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit“ basierend auf einer [³³P]-dATP-Markierung (Amersham Buchler, s. Firmenprotokoll im Anhang).

13.1. Datenbankvergleich der Sequenzen der Buchenklone

Im Anschluß an das Sequenzieren wurden die so ermittelten Sequenzen der Buchenklone mittels der EMBL-Datenbank verglichen.

Die mit Hilfe des Differentiellen Displays isolierten Sequenzstücke lagen in einem Größenbereich zwischen 300 und 700 bp. Diese Sequenzgröße war verhältnismäßig klein. Der Datenbankvergleich lieferte aber keine bekannten Homologien. Dafür sollten eben diese Sequenzstücke im kodierenden Bereich liegen und zusätzlich große Homologien zu bereits bekannten Sequenzen aufweisen. Aus diesem Grund wurden die Sequenzstücke zusätzlich in der TIGR *Arabidopsis thaliana* -EST-Datenbank verglichen.

14. Restriktionsverdau der Plasmid-DNA

E. coli Bakterien mit einem Insert größer als 200 bp wurden über Nacht vermehrt. Nach Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte das Herausschneiden des Inserts aus dem Vektor mit Restriktionsenzymen. Die Durchführung des Restriktionsansatzes fand in einem Vol. von 80 µl statt: pro 30 µg Plasmid-DNA wurden je 20 U von Enzym 1 und 2 eingesetzt und für ca. 3 h bei der optimalen Enzymtemperatur inkubiert. Die paarweise verwendeten Restriktionsenzyme (Boehringer Mannheim) waren sowohl *ApaI* und *SacI* als auch *SphI* und *SpeI*; die Größe der Inserts lag durch die gewählten Schnittstellen entweder um 108 bp oder 81 bp über der des ursprünglich einklonierten. Die Enzyme *ApaI* und *SacI* wurden mit dem Puffer A (33 mM Tris-Acetat, 10 mM Magnesium-Acetat, 66 mM Kalium-Acetat, 0,5 mM DTT)

versetzt und bei 32°C inkubiert. Der Restriktionsverdau mit den Enzymen *SphI* und *SpeI* fand mit Puffer M (10mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM Dithioerythritol) bei 37°C statt. Die Inserts wurden auf einem 1%-igen Agarosegel (TBE) elektrophoretisch aufgetrennt und durch einen Standard (DNA-Marker V, Appligene) bezüglich ihrer Größe kontrolliert. Die Isolierung der Inserts aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe von Glasmilch (Genomed, Jetsorb). Die Quantifizierung der Inserts wurde photometrisch (A₂₆₀) (Genequant, Pharmacia) durchgeführt.

15. Dot-Blot Analyse der Insert-DNA der Buchenklone

15.1. Herstellen eines Dot-Blots

Eine schnelle Selektion positiver Klone - basierend auf der Methode des Differentiellen Displays - lieferte eine Hybridisierung nach der Arbeit von Vögeli-Lange et al. (1996). Dazu wurde jeweils 0,1 µg als Doppelproben jeder Insert-DNA mit Hilfe einer Slot-Blot Apparatur (Minifold System II, Schleicher & Schüll, Dassel) auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) aufgetragen. Zuvor wurden die Proben (0,1 µg Insert-DNA auf 50 µl TE pH 8,0) 5 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Die Membran wurde mit je 100 µl TE (pH 8,0) pro Slot äquilibriert, danach wurden die Proben unter Vakuum aufgetragen und die Slots 2-mal mit je 100 µl TE (pH 8,0) nachgewaschen. Im Anschluß erfolgte eine alkalische Behandlung des Blots nach Maniatis et al. (1982): 5 min denaturieren (0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl), 5 min neutralisieren (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-Cl, pH 7,4), 5 min 2 X SSC. Nach dem Trocknen der Membran für mindestens 30 min bei RT fand das Fixieren der Proben auf der Membran über UV-Crosslinking (UV-Crosslinker 1800, Stratagene) statt. Der Blot wurde entweder bei 4°C gelagert oder sofort hybridisiert.

15.2. Radioaktive Zufallsmarkierung der Sonde mit [³²P]-dATP

Ausgehend von 1 µg poly (A)⁺-RNA wurde eine Erststrang-cDNA-Synthese durchgeführt - wie bereits beschrieben (s. II.9.1.2.). Die radioaktive Markierung der cDNA (40 µl) erfolgte anschließend mit [³²P]-dATP nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) mit Hilfe des Random Primed DNA Labelling Kit (Hexa Primer I, Appligene) für 1 h bei 37°C laut Firmenprotokoll.

15.3. Hybridisieren der Dot-Blot Membran

Die Membran wurde zur Absättigung freier Bindungsstellen 1 h bei 42°C prähybridisiert (50% Formamid, 5 X SSC, 0,5 X Denhardt's, 0,5 % SDS, 0,1 mg/ml Heringssperma-DNA). Nach Zugabe der radioaktiv-markierten ([³²P]-dATP) Sonden-DNA erfolgte die Hybridisierung der Blots in der gleichen Lösung über 16 h bei 42°C. Im Anschluß wurde die Membran mehrmals gewaschen:

1. 2-mal 5 min RT in Waschlösung 1 (2 X SSC; 0,1% SDS)
2. 30 min bei 65°C in Waschlösung 1
3. 5 - 10 min bei 65°C in Waschlösung 2 (0,2 X SSC; 0,1% SDS).

Zur Autoradiographie wurde die Membran je nach Stärke des Hybridisierungssignals 1 - mehrere Tage auf einer Phosphorimager-Platte (Fuji 2000 X-BAS) exponiert. Die Entwicklung und Auswertung erfolgte wie bereits unter II.8.2. beschrieben.

Als Sonden dienten die in eine cDNA umgeschriebenen mRNAs (aus Kontroll- und UV-B-behandelten Pflanzen, s. II.7. und II.9.2.2.), die sowohl für die *in vitro* Translation als auch für die DDRT-PCR eingesetzt worden waren.

Die daraus ermittelten induzierten bzw. reprimierten Klone bildeten die Sonden für die anschließende Hybridisierung der Northern-Blot Analyse.

15.4. Wiederholtes Hybridisieren der Membran - Entfernen der Gensonde

Zum Entfernen der Gensonde wurde die Membran in eine kochende 0,1%-ige SDS-Lösung getaucht und anschließend bei RT abgekühlt. Zur Kontrolle erfolgte eine erneute Autoradiographie der Membran.

16. Northern-Blot Analyse der Buchenklone

Die Methode des Differentiellen Displays wird als Artefakt-anfällig in der Literatur diskutiert. Ein Grund liegt sicherlich in der niedrigen Anlagerungs-Temperatur bei der PCR, was Fehlbindungen der Primer verursachen könnte. Aus diesem Grund ist eine Bestätigung der differentiellen Transkripte im Northern-Blot zwingend notwendig.

Der Northern-Blot lieferte einerseits die Bestätigung der Klone und andererseits die Quantifizierung der Transkripte über den Tagesgang.

16.1. Erstellen einer Northern-Blot Membran

Als Ausgangsmaterial diente die isolierte RNA aus den Blättern der 1. Blattetage (Mischproben aus mindestens 6 und maximal 10 Pflanzen) der verschiedenen Behandlungen zu den Erntezeitpunkten (s. Ernteschema S. 50). Davon wurde jeweils 10 - 15 µg RNA (s. II.9.1.1.) in einem denaturierenden Formaldehydgel (1,5% Agarose) aufgetrennt. Die Agarose wurde in Gelpuffer (20 mM MOPS, pH 8,0; 1 mM EDTA; 5 mM Na-Acetat, pH 8,0) gelöst und mit 2 M Formaldehyd versetzt, gegossen und polymerisierte mindestens für 1 h. Währenddessen wurden die Proben mit Probenpuffer (1,16 M Formaldehyd, 50% deionisiertes Formamid, je 0,008% Bromphenolblau und Xylencyanolblau in Gelpuffer, 0,25 µg/ ml Ethidiumbromid) versetzt. Das Zusetzen des Ethidiumbromids zum Probenpuffer (2 bzw. 0,5 Vol in Abhängigkeit von der RNA-Konzentration) ermöglichte die direkte Färbung der ribosomalen RNA-Banden. Anschließend erfolgte das Denaturieren der Proben für 10 min bei 65°C und die

elektrophoretische Auftrennung über 4 h bei 50 V. Zur Größenbestimmung der hybridisierten Sonde wurde 12 µg eines Größenstandards (RNA-Marker I, Boehringer, Mannheim) ebenfalls mit aufgetragen (s. Anhang 3.3.).

Der Transfer der im Formaldehydgel aufgetrennten RNAs auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) fand mittels eines Kapillarblots über Nacht in 20 X SSC statt. Am nächsten Tag wurde die Membran für mindestens 30 min bei RT getrocknet und die RNA wurde durch UV-Crosslinking auf der Membran fixiert. Der Blot wurde entweder bei 4°C aufbewahrt oder direkt in die Hybridisierung eingesetzt.

16.2. Hybridisierung der Northern-Blots

Die mit Hilfe der DDRT-PCR isolierten cDNA-Klone wurden ebenso wie unter II.15.2. beschrieben radioaktiv markiert und anschließend als Sonden für die Hybridisierung der Blots verwendet.

So konnten durch den Vergleich der Zeitkinetiken einzelner Transkripte unter verschiedenen Versuchsbedingungen (Exposition unter erhöhtem UV-B, Starklicht, ambientes Ozon, erhöhtes Ozon mit und ohne erhöhtem UV-B) Aussagen über die Wechselwirkung verschiedener Umweltparameter (UV-B, Starklicht, Ozon und Ozon kombiniert mit UV-B) getroffen werden.

17. Amplifizierung der 3'- und 5'-Enden der cDNA einzelner Klone

Zur Amplifizierung der 5'-Enden der cDNA (2 µl) wurden verschiedene Methoden ausgetestet. Es wurde sowohl die Methode nach Frohman et al. (1988) eingesetzt als auch das 5'-RACE (= rapid amplification of cDNA ends) System (Gibco BRL, Version 2.0) in einem Gesamtvolumen von 50 µl laut Firmenprotokoll.

17.1. 5'-RACE (= rapid amplification of cDNA ends)

Einzelne vollständige cDNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des RACE-Protokolls von Gibco BRL, Version 2.0 kloniert.

Für die Erststrang-cDNA-Synthese wurde nach den Angaben des Herstellers mit 1 µg Gesamt-RNA, 2,5 pmol genspezifischen Primer, 0,1 Vol. 10 X Puffer, 2 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl dNTP-Mix und 2 µl 0,1 M DTT durchgeführt. Nach dem Äquilibrieren der Reaktion für 2 min bei 42°C wurde 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase zugegeben und es erfolgte die Synthese für 50 min bei 42°C. Das 15-minütige Erhitzen auf 70°C stoppte die Synthesereaktion ab. Nach Zugabe von 1 µl RNase H wurde die Reaktion für 20 min bei 37°C weiter inkubiert. Die Reinigung der DNA von überschüssigen Primern und Nukleotiden gewährte die Säulenchromatographie (S-200 MicroSpin™ Columns, Pharmacia). Danach erfolgte ein C-Tailing der cDNA (2 µl) mit der terminalen Transferase. Diese dC-getailte cDNA (5 µl) wurde

in die PCR mit dem genspezifischen Primer und einem Anchor-Primer eingesetzt: 200 µM dNTP, 0,1 Vol. 10X Enzym-Puffer, 3,5 U Expand Long Template (Boehringer Mannheim). Die Amplifizierung fand mit 35 Zyklen unter folgenden Bedingungen statt: 2 min 94°C, 1 min 94°C, 2 min Primer-spezifische Anlagerungs-Temperatur (66°C für Klon UV-R 10/28-1), 2 min 72°C, 35 Zyklen und einer abschließenden Verlängerung 15 min bei 72°C. Das gesamte PCR-Produkt wurde anschließend auf einem 1,5%-igen TAE-Agarosegel in Anwesenheit eines DNA-Größenmarkers (Marker VI, Boehringer Mannheim) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, aus dem Gel eluiert (s. II.18.), in den pGEM-T-Vektor (Promega) kloniert (s. II.10.), eine Glycerin-Stammkultur angelegt und sequenziert (s. II.13.).

17.2. Amplifizierung der 3'-Enden der cDNA

Die Erststrang-Synthese wurde bereits unter II.9.1.2. (Ausnahme: ohne radioaktive Markierung, s. S. 31) beschrieben. Danach wurde 1 µl RNase H zugegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Zweitstrang-cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des Marathon™ cDNA Amplification Kits (3'-RACE, Clontech und Gibco BRL) laut Firmen-Protokoll. Die anschließende Adapter-Ligation wurde mit der T4-DNA-Ligase (Gibco BRL) über 3-4 Tage bei 4°C durchgeführt. Der Erfolg der Adapter-Ligation wurde durch die anschließende PCR getestet:

10 pmol genspezifischer Primer, 10 pmol Adapter-Primer, 5 µl 1:50 bzw. 1:250 verdünnte Adapter-ligierter DNA, 200 µM dNTP, 0,5 U High-Fidelity-Enzym (Boehringer Mannheim), 0,1 Vol. 10X Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ auf 50 µl H₂O auffüllen.

Die PCR fand unter nachfolgenden Bedingungen statt: 1 Zyklus: 1 min 94°C, 2 min Anlagerungs-Temperatur, 40 min Extension (72°C); 30 Zyklen: 1 min 94°C, 1 min Anlagerung, 1 min 72°C; 15 min 72°C; 4°C.

III. ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war es, frühe Zeitpunkte UV-B-induzierter Veränderungen zuerst auf Gesamtproteinebene und dann auf Transkriptebene zu erfassen. Die detaillierten Induktions- und Repressionsfaktoren wurden im Anhang zusammengefaßt. Die darin verwendete Gliederung der Überschriften entspricht zur besseren Übersicht den Überschriften in diesem Kapitel.

Für diese Untersuchungen erfolgte eine standardisierte Anzucht der Buchensämlinge; die Sämlinge wurden über einen Zeitraum von 8 Wochen unter UV-B ($\text{PAR } 420 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\text{UV-B}_{\text{BE}} 75,3 \text{ mW m}^{-2}$) kultiviert. Unter diesem UV-B/PAR - Verhältnis war die Anzucht den natürlichen Bedingungen sehr ähnlich (Thiel et al., 1996). Nach einer 10-tägigen Adaption an die Starklicht-Bedingungen im Prototyp (ohne UV-B) wurden die Pflanzen 6 h täglich mit erhöhter UV-B-Strahlung ($\text{UV-B}_{\text{BE}} 430 \text{ mW m}^{-2}$) bzw. ohne UV-B (Starklicht-Kontrolle: $\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) behandelt (s. Abb. 8 und 9). Geerntet wurde jeweils die 1. Blattetage, da diese Blätter zu diesem Zeitpunkt bereits ausdifferenziert waren, und somit als Modellsystem für ältere Bäume dienen können.



Abb. 8: 10 wöchige Buchensämlinge ($\text{PAR } 420 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\text{UV-B}_{\text{BE}} 75,3 \text{ mW m}^{-2}$), die von der 8. Woche an unter folgenden Bedingungen kultiviert wurden:

A+B: Starklicht (A: $\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\text{UV-B}_{\text{BE}} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$); die Reihe B wurde zusätzlich mit UV-B-Strahlung ($\text{UV-B}_{\text{BE}} < 430 \text{ mW m}^{-2}$) behandelt. Phänotypisch sind zwischen den Pflanzen, die unter Starklicht-Bedingungen ohne (A) bzw. mit (B) UV-B-Strahlung exponiert wurden, visuell keine Unterschiede zu erkennen; eingesetzt für die Untersuchungen wurden jeweils die Primärblätter.



Abb. 9: 10 Wochen alte Buchensämlinge. Von der 8. Woche an wurden diese im Prototyp des Sonnensimulators der GSF (Neuherberg) unter folgenden Bedingungen kultiviert: Starklicht-Kontrolle ($\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\text{UV-B}_{\text{BE}} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$) und zusätzliche Exposition mit UV-B-Strahlung ($\text{UV-B}_{\text{BE}} < 430 \text{ mW m}^{-2}$).

1. 2D-PAGE des löslichen Gesamtproteins der Primärblätter

Zu welchen Zeitpunkten nach erhöhter UV-B-Exposition sind Unterschiede auf Ebene der löslichen Gesamtproteine zu sehen? Zugunsten von Erntezeitpunkten über einen längeren Zeitraum (s. Abb. 10) erfolgte aufgrund des begrenzten Pflanzenmaterials das Aufarbeiten von Einzelproben bestehend aus je 2 Primärblättern.

Die 2D-Gele der 12 Proben (s. II.6.1.) wurden nach der Silber-Färbung (Nachweisgrenze 1-30 ng Protein/Bande) eingelesen (6cx OmniMedia XRS-Scanner).

Wie bereits erwähnt, fand die Anzucht der Sämlinge unter Schwachlicht mit UV-B-Anteil ($\text{PAR } 420 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\text{UV-B}_{\text{BE}} 75,3 \text{ mW m}^{-2}$) statt. Das Interesse der vorliegenden Arbeit lag darin, sowohl induzierte als auch reprimierte Proteine nach UV-B-Exposition im Vergleich zur Starklicht-Kontrolle zu erfassen. Aus diesem Grund wurden die Proteine einerseits unter Starklicht-Exposition (Prototyp-Kontrolle, Starklicht: $\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\text{UV-B}_{\text{BE}} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$) im Tagesgang betrachtet und andererseits nach UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (s. Abb. 9).

Die 2D-PAGE Auftrennung der löslichen Gesamtproteine zu den unterschiedlichen Zeitpunkten wurde stets zweifach durchgeführt, und jeweils die Gele mit der besten Auftrennung wurden ausgewertet.

Um die Gele untereinander in Beziehung setzen zu können, erfolgte der Vergleich der Gele über die Intensität der 66 kDa Bande des aufgetragenen Molekulargewicht (MG)-Standards nach der Silber-Färbung. Bis zu 35 Proteinspots wurden pro Gel quantifiziert und in die Auswertung miteinbezogen. Die Ermittlung des Hintergrunds basierte auf mehreren Gelflächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 36. Diese wurden bei der Quantifizierung der Proteinspots berücksichtigt. Die einzelnen Proteine erhielten zum direkten Vergleich zu den verschiedenen Zeitpunkten während der Kinetik auf allen Gelen der löslichen Gesamtproteine dieselben Nummern (s. Anhang Tab. 31). Die Quantifizierung der Proteinspots wurde mittels einer geeigneten Software (Raytest) durchgeführt.

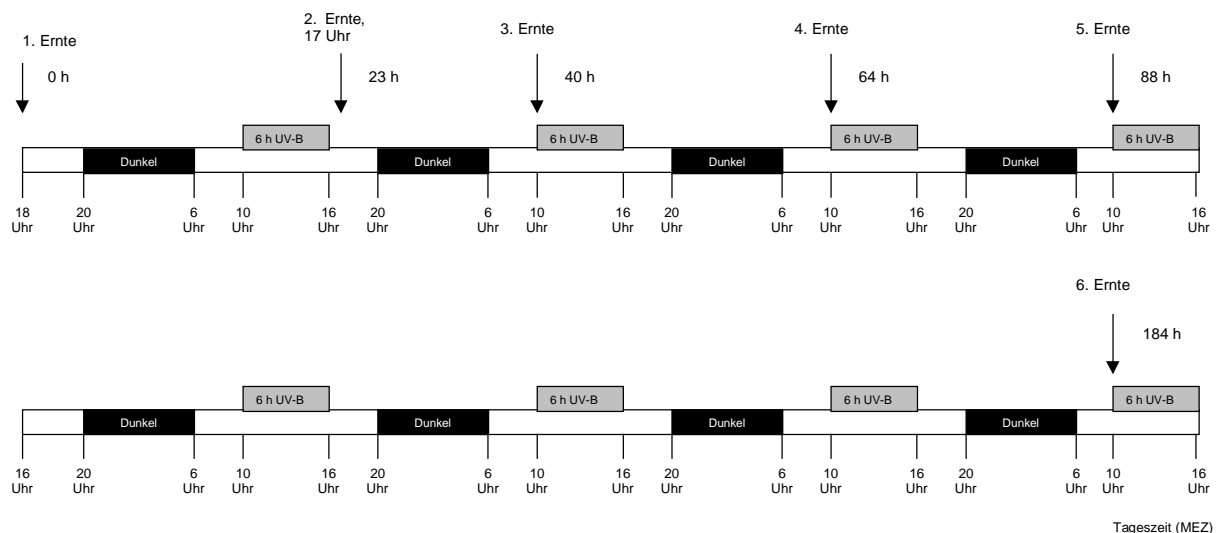


Abb. 10: Erntezeitpunkte mit den verschiedenen Lichtbedingungen aus E 1. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Primärblätter geerntet, das lösliche Gesamtprotein aufgereinigt und mittels der 2D-PAGE aufgetrennt. Die Experimente wurden unter Starklicht ohne UV-B (=Kontrollen; $PAR\ 1300\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$, $UV-B_{BE} < 0,5\ mW\ m^{-2}$) und mit UV-B-Exposition ($PAR\ 1300\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$, $UV-B_{BE}\ 720\ mW\ m^{-2}$, 6 h täglich) durchgeführt.

1.1. Molekulargewichts (MG)-Angaben und Isoelektrische Punkte (pI) der quantifizierten löslichen Gesamtproteine

Die quantifizierten Proteinspots der Buchenblätter lagen in einem MG-Bereich von 12,7 bis 77,1 kDa und in einem pI-Bereich von 4,2 - 9,4 (s. Abb. 11 bis 13 und Abb. 50 und 51 im Anhang). Die Einteilung der Proteine entsprechend dem MG und der pI-Werte ist der Tab. 8 zu entnehmen.

Tab. 8: 35 quantifizierte lösliche Gesamtproteine wurden entsprechend ihrem pI in saure, neutrale und basische Spots unterteilt. Die Definition der pI-Bereiche ist der Tab. zu entnehmen. Ebenso sind die Proteine (Anzahl der Proteine = n) nach ihrem MG (kDa) in Gruppen eingeteilt.

Isoelektrischer Punkt (pI)	pH - Bereich	lösliche Gesamtproteine (n)
saurer pI	3 - 6,5	13
neutraler pI	6,55 - 7,5	14
basischer pI	7,55- 10,5	8
Molekulargewichte (MG)	kDa	lösliche Gesamtproteine (n)
kleine Proteine	< 30	13
mittlere Proteine	30 - 60	20
große Proteine	> 60	2

1.2. Tageszeitliche Änderungen des Gesamtproteinmusters nach UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle

Bei Gegenüberstellung der reprimierten Proteine nach UV-B-Exposition bezogen auf die entsprechende Starklicht-Kontrolle zeigte sich ein sinusförmiger Verlauf über die Zeitkinetik (Tab. 9 und Anhang Tab. 31): die Maxima der Repression lagen bei der 2. Ernte bei 50% (s. Abb. 11), bei der 4. Ernte bei 47% (s. Abb. 13) und bei der 6. Ernte bei 32 % (s. Anhang Abb. 51). Die maximalen Werte der induzierten Proteine waren mit je 56% bei der 3. Ernte (s. Abb. 12) und 5. Ernte gegenläufig (s. Anhang Abb. 50).

Tab. 9: Relative Anteile (%) der löslichen Gesamtproteine unter UV-B-Exposition bezogen auf die entsprechende Starklicht-Kontrolle zu den 5 verschiedenen Erntezeitpunkten während der gesamten Kinetik. Die Experimente wurden unter Starklicht ohne UV-B (=Kontrollen; PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, UV-B_{BE} < 0,5 mW m⁻²) und mit UV-B-Exposition (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, UV-B_{BE} 720 mW m⁻², 6 h täglich) durchgeführt (s. Ernteschema Abb. 10).

Gesamtproteine unter UV-B-Exposition bezogen auf die entsprechende Starklicht-Kontrolle (%)					
Erntezeitpunkt Gesamtdauer UV-B-Expsotion (h)	Ernte 2 (6 h UV-B)	Ernte 3 (6 h UV-B)	Ernte 4 (12 h UV-B)	Ernte 5 (18 h UV-B)	Ernte 6 (48 h UV-B)
Induziert	5,9	55,9	21,9	55,9	17,6
Reprimiert	50	14,7	46,9	8,8	32,4
Unverändert	44,1	29,4	31,2	35,3	50

Bei der Auswertung dieser Proteine nach dem Kriterium der UV-B-Expositionsdauer zeigte sich, daß bei der Ernte direkt im Anschluß an die 6-stündige UV-B-Behandlung (2. Ernte) der Anteil der reprimierten und unveränderten Proteine überwog. Bei der 3. Ernte - als die Pflanzen lediglich mit PAR im Tag-Nacht-Rhythmus nachbehandelt worden waren – dominierten die induzierten Proteine; dies war wiederholt bei der 5. Ernte (insgesamt 18 h UV-B) zu erkennen. Nach einer Gesamtdauer von 6 und 18 h UV-B-Exposition (3. Ernte und 5. Ernte) unter vergleichbarer MEZ (10 Uhr) zeichnete sich eine Dominanz der induzierten Proteine gegenüber den reprimierten ab.

2. Ernte

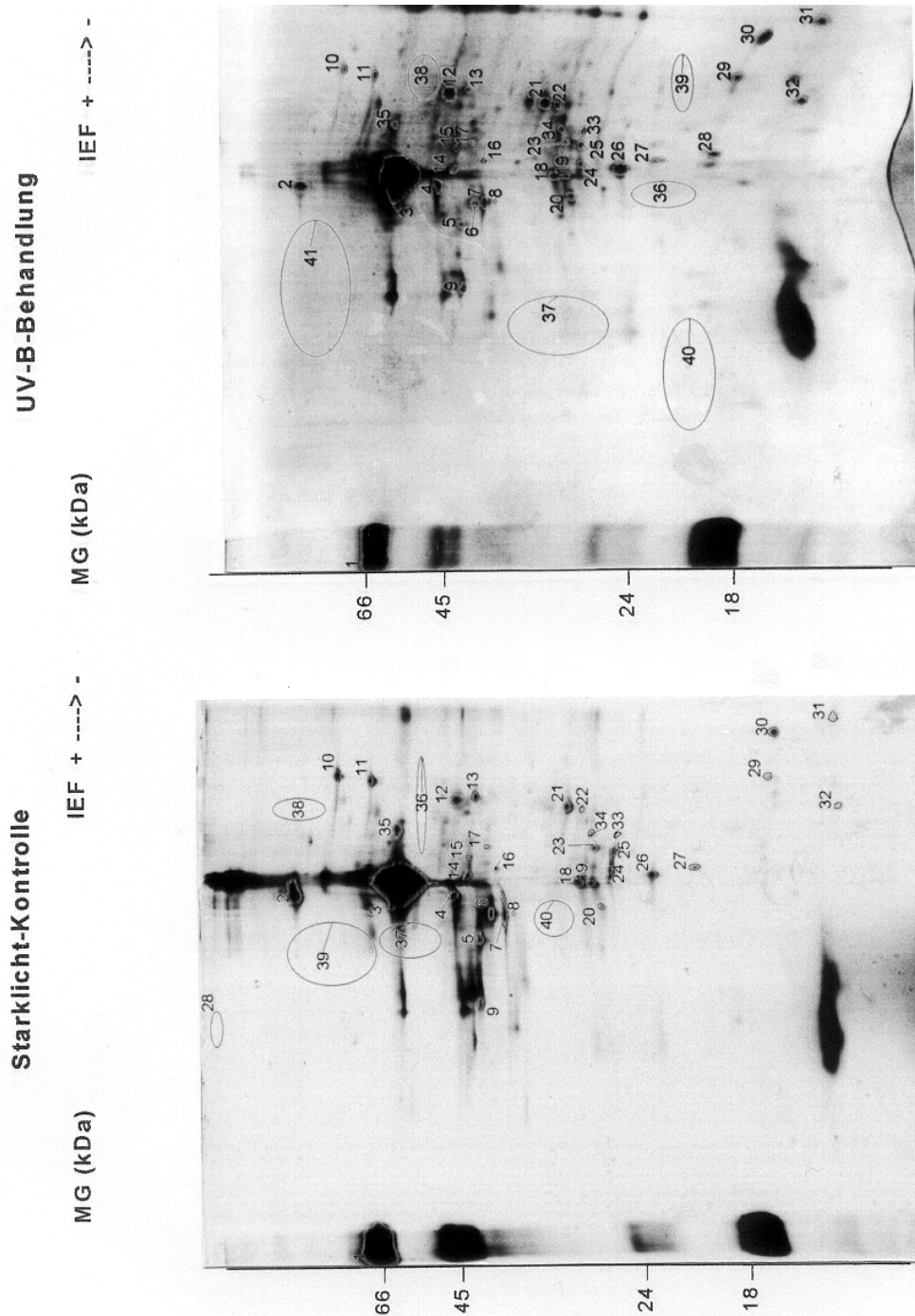


Abb. 11: Silberfärbung der 2D-PAGE Analyse des löslichen Gesamtproteins isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge zum 2. Erntezeitpunkt (s. Ernteschema S. 42). Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen exponiert ($\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $\text{UV-B}_{\text{BE}} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$) und für 6 h unter UV-B exponiert ($\text{UV-B}_{\text{BE}} 720 \text{ mW m}^{-2}$). Jeweils $80 \mu\text{g}$ Protein wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die Spots sind mit den identischen Nummern gekennzeichnet. Die Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 36 – wurden zur Hintergrundermittlung bei der Quantifizierung der Proteinspots berücksichtigt.

3. Ernte

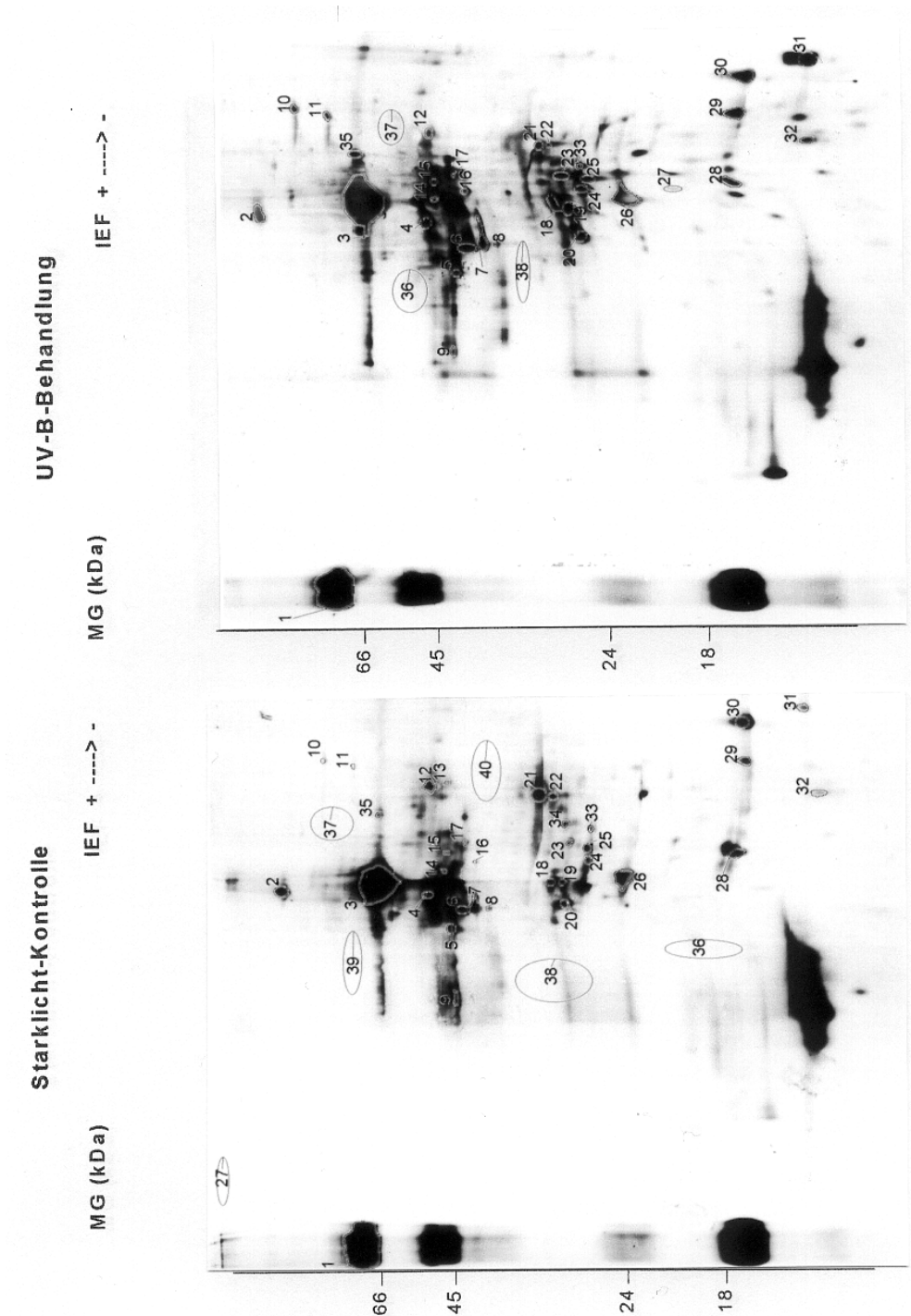


Abb. 12: Silberfärbung der 2D-PAGE Analyse des löslichen Gesamtproteins isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge zum 3. Erntezeitpunkt (s. Ernteschema S. 42). Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen exponiert ($\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $\text{UV-B}_{\text{BE}} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$) und für 6 h unter UV-B exponiert ($\text{UV-B}_{\text{BE}} 720 \text{ mW m}^{-2}$). Jeweils $80 \mu\text{g}$ Protein wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die Spots sind mit den identischen Nummern gekennzeichnet. Die Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 36 – wurden zur Hintergrundermittlung bei der Quantifizierung der Proteinspots berücksichtigt.

4. Ernte

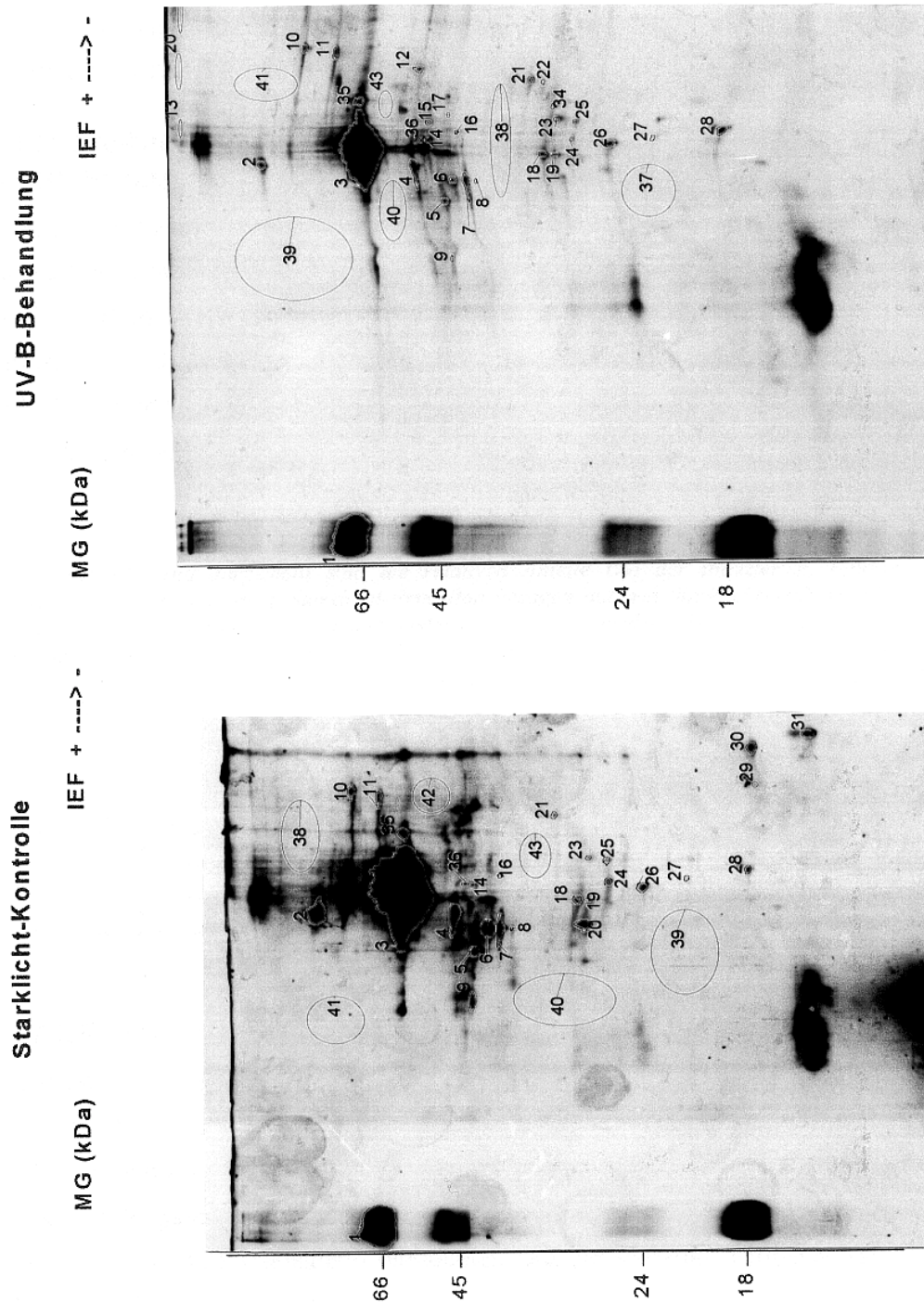


Abb. 13: Silberfärbung der 2D-PAGE Analyse des löslichen Gesamtproteins isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge zum 4. Erntezeitpunkt (s. Ernteschema S. 42). Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen exponiert ($\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $\text{UV-B}_{\text{BE}} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$) und für 12 h unter UV-B exponiert ($\text{UV-B}_{\text{BE}} 720 \text{ mW m}^{-2}$). Jeweils $80 \mu\text{g}$ Protein wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die Spots sind mit den identischen Nummern gekennzeichnet. Die Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 36 – wurden zur Hintergrundermittlung bei der Quantifizierung der Proteinspots berücksichtigt.

1.2.1. UV-B-abhängige Proteine

Protein 28 (17 kDa; pI 6,8) war das einzige stets induziert vorliegende unter UV-B-Exposition bezogen auf die entsprechende Starklicht-Kontrolle. Dieses Protein lag unter Starklicht-Exposition im Tagesgang reprimiert vor (s. Abb. 11-13, Anhang 50-51 und Tab. 31). Das bedeutet, daß das Protein 28 durch UV-B induziert wurde.

1.3. Tageszeitliche Änderungen des Gesamtproteinmusters unter Starklicht-Exposition bezogen auf den Starklicht-Nullwert

Die Repression des löslichen Gesamtproteinmusters unter Starklicht-Exposition bezogen auf den Starklicht-Nullwert stieg während des Experimentes von 21% auf 67% ständig an. Beim Bezug auf den Starklicht-Nullwert war im zeitlichen Verlauf ein Anstieg von insgesamt 46% zu erkennen (s. Tab. 10 und Anhang Tab. 32). Bei Betrachtung der induzierten und unveränderten Proteine bezogen auf den Starklicht-Nullwert zeigte sich während der Kinetik eine Abnahme. Der Anteil der prozentual induzierten Proteine lag zum 6. Erntezeitpunkt bei ca. 10%.

Tab. 10: Zusammenfassend dargestellt sind die relativen Anteile (%) der induzierten, reprimierten und unveränderten Gesamtproteine unter Starklicht-Exposition bezogen auf den Starklicht-Nullwert über die Zeitkinetik. Proteine mit Repressions- und Induktionsfaktoren $< 1,6$ wurden als unverändert bezeichnet. Die Pflanzen wurden unter Schwachlicht angezogen ($PAR\ 420\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$; $UV-B_{BE}\ 75,3\ mW\ m^{-2}$), die Experimente wurden unter Starklicht ohne UV-B ($PAR\ 1300\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$, $UV-B_{BE} < 0,5\ mW\ m^{-2}$) durchgeführt (s. Ernteschema S. 42).

Relative Anteile des löslichen Gesamtproteins unter Starklicht-Exposition (%)					
Erntezeitpunkt	2	3	4	5	6
Induziert	23,5	22,9	25,7	17,6	8,8
Reprimiert	20,6	40	48,6	61,8	67,6
Unverändert	55,9	37,1	25,7	20,6	23,6

2. 2D-PAGE der *in vitro* translatierten Proteine

Die Zeitpunkte für die Erstellung einer Kinetik setzte sich aus mehreren Erntezeitpunkten (0, 4, 7, 10, 14, 18, 24, 28, 31 und 34 h) während des Experimentes (täglich 6 h, insgesamt 12 h UV-B) zusammen (s. Abb. 14). Von je 5 bzw. 6 verschiedenen Pflanzen wurden die Blätter miteinander gemischt und deren RNA extrahiert. Die aus dieser RNA isolierte poly (A)⁺ wurde für die *in vitro* Translation eingesetzt. Die translatierten Proteine der jeweiligen poly (A)⁺-RNA-Proben wurden 2-dimensional aufgetrennt und anschließend quantifiziert. Als interner Bezugspunkt zur Standardisierung der Gele diente Spot 1, der bereits im Reticulocyten-Lysat - ohne Durchführung einer *in vitro* Translation - auf dem 2-dimensionalen Gel vorhanden war (s. Anhang Abb. 52). Für einen direkten Vergleich der *in vitro* translatierten Proteine der einzelnen Gele erhielten die sich entsprechenden Spots auf allen

Gelen dieselben Nummern. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer geeigneten Software (Raytest). Die Mittelwerte der Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 88 - wurden zur Hintergrundermittlung bei der Quantifizierung der *in vitro* translatierten Polypeptide abgezogen.

Die 2D-PAGE der *in vitro* translatierten Proteine wurden pro Zeitpunkt zweifach durchgeführt; ausgewertet wurden die Gele mit der besten Auftrennung.

Aufgrund der bereits unter UV-B-Exposition ($\text{PAR } 420 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\text{UV-B}_{\text{BE}} 75,3 \text{ mW m}^{-2}$) durchgeführten Pflanzenanzucht lagen die Induktions- bzw. Repressionsfaktoren der *in vitro* translatierten Proteine häufig zwischen 1 und 3. Die Ursache dafür könnte in der Starklicht-Anzucht der Sämlinge liegen. Deckmyn et al. zeigten 1994 an Untersuchungen mit *Phaseolus vulgaris* cv. Label, daß unter Starklicht-Bedingungen angezogene Pflanzen Blätter entwickeln, die gegenüber UV-B-Schäden wesentlich resistenter sind.

Bei der Auswertung blieben Spots mit Induktions- oder Repressionsfaktoren $< 1,5$ unberücksichtigt. Änderungsfaktoren $> 1,6$ wurden als Induktion oder Repression in die Auswertung miteinbezogen. Waren Spots nur bei einem von zwei miteinander in Bezug ausgewerteten Gelen vorhanden, so wurden diese mit „+“ (für vorhanden) in die Quantifizierung aufgenommen und wie ein Faktor größer 1,5 bei der nachfolgenden prozentualen Berechnung behandelt.

Während des UV-B-Experiments waren Starklicht-Bedingungen vorhanden. Durch die Auswertung des Tagesganges unter Starklicht wurden Unterschiede infolge der hohen PAR-Intensität erfaßt. Der Einfluß der UV-B-Exposition wurde durch die Gegenüberstellung der *in vitro* translatierten Proteine nach UV-B-Behandlung im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle aufgezeigt.

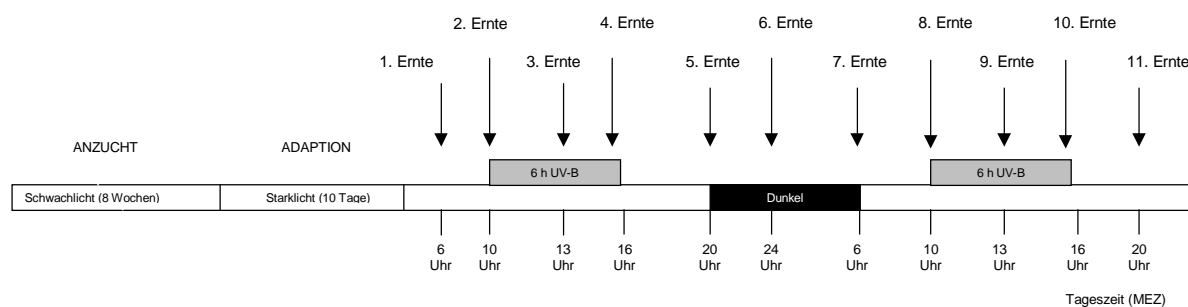


Abb. 14: Die Erntezeitpunkte mit den verschiedenen Lichtbedingungen während der Experimente E 3 und E 4. Zu den angegebenen Zeitpunkte wurden die Primärblätter geerntet, die poly (A)⁺-RNA aus den Blättern extrahiert und nach Durchführung der *in vitro* Translation mittels der 2D-PAGE aufgetrennt. Während der Lichtperiode wurden die Pflanzen unter Starklicht exponiert (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV-B_{BE} < 0,5 mW m⁻²) und die UV-B-Behandlung erfolgte täglich über 6 h (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV-B_{BE} 430 mW m⁻²).

2.1. MG-Angaben und pI-Werte der quantifizierten *in vitro* translatierten Polypeptide

Pro Gel wurden jeweils bis zu 86 *in vitro* translatierte Proteinspots quantifiziert und zugeordnet (s. Abb. 15-18 und im Anhang Abb. 53-58).

Die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension erfolgte in einem pH-Bereich zwischen 3 - 10,5 nach ihrem pI (s. Tab. 11): 54 Proteine zeichneten sich durch einen sauren pI (pH 3 - 6,5), 20 durch einen neutralen (6,55-7,5) und 12 durch einen basischen (7,55-10,5) aus. Die Molekulargewichte (MG) der quantifizierten Proteine lagen in einem Bereich zwischen 12,9 und 90,8 kDa (s. Tab. 11).

Tab. 11: Einteilung der 86 quantifizierten *in vitro* translatierten Proteine entsprechend ihrem pI in saure, neutrale und basische Spots. Die Definition der pI-Bereiche ist der Tab. zu entnehmen. Ebenso sind die Proteine (Anzahl der Proteine = n) nach ihrem MG (kDa) gruppiert.

Isoelektrischer Punkt (pI)	pH - Bereich	<i>in vitro</i> translatierte Proteine (n)
saurer pI	3 - 6,5	54
neutraler pI	6,55 - 7,5	20
basischer pI	7,55- 10,5	12
Molekulargewichte (MG)	kDa	<i>in vitro</i> translatierte Proteine (n)
kleine Proteine	< 30	25
mittlere Proteine	30 - 60	47
große Proteine	> 60	14

Ernte 1 und Ernte 2

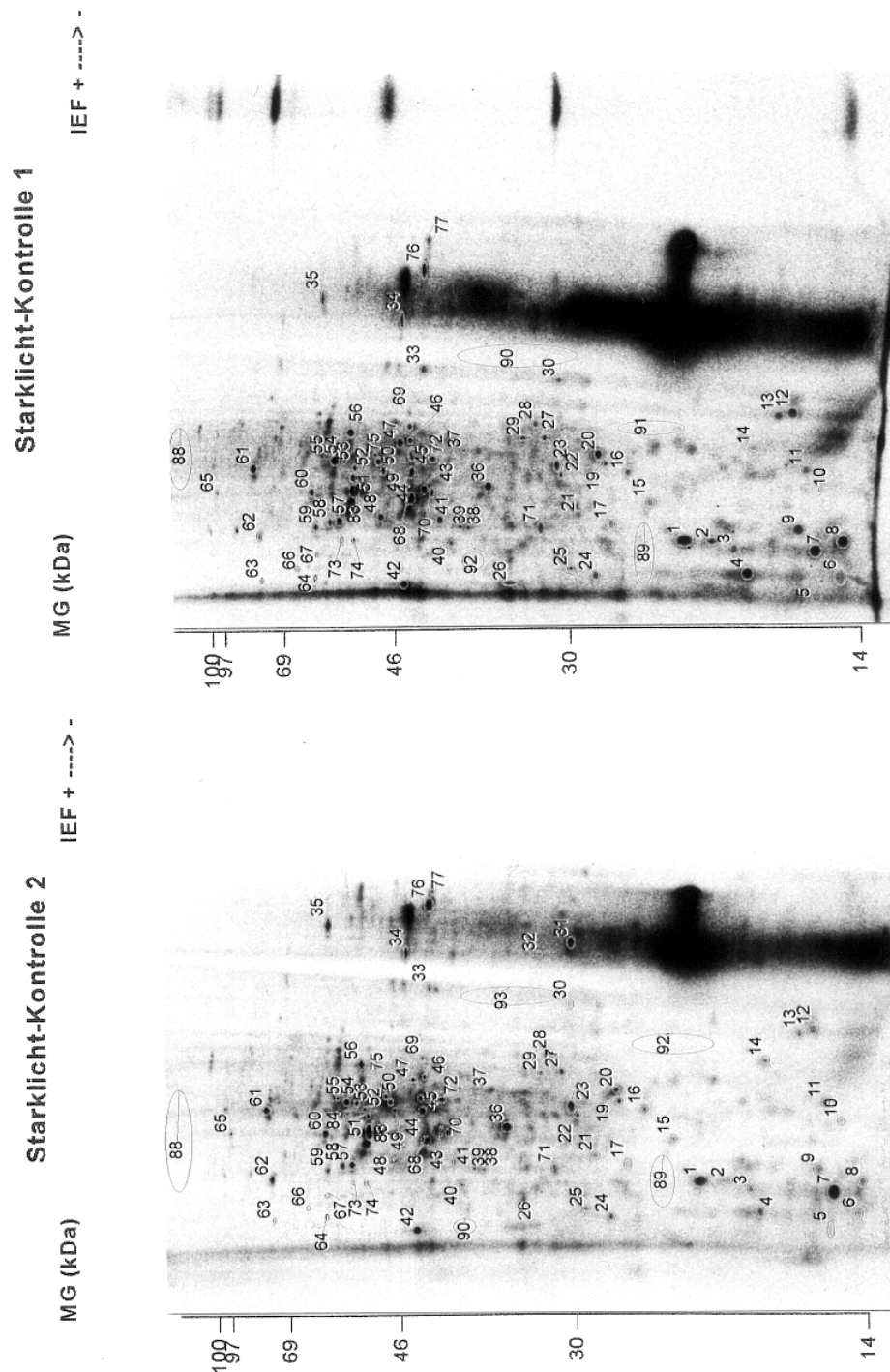


Abb. 15: Autoradiographie der 2D-PAGE Analyse der *in vitro* translatierten poly (A)⁺-RNA isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge. Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, UV-B_{BE} < 0,5 mW m^{-2}) exponiert. Starklicht-Kontrolle 1 (Ernte 1, unten) und Starklicht-Kontrolle 2 (Ernte 2, oben) sind hier abgebildet (s. Ernteschema S. 50). Die *in vitro* Translation der isolierten poly (A)⁺-RNA erfolgte mittels einem Reticulocytensylat und jeweils 500 000 dpm TCA-unlösliche Radioaktivität wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die vergleichbaren Spots sind mit identischen Nummern gekennzeichnet. Die Mittelwerte der Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 88 – wurden zur Hintergrundermittlung bei der Quantifizierung der *in vitro* translatierten Polypeptide abgezogen.

Ernte 3

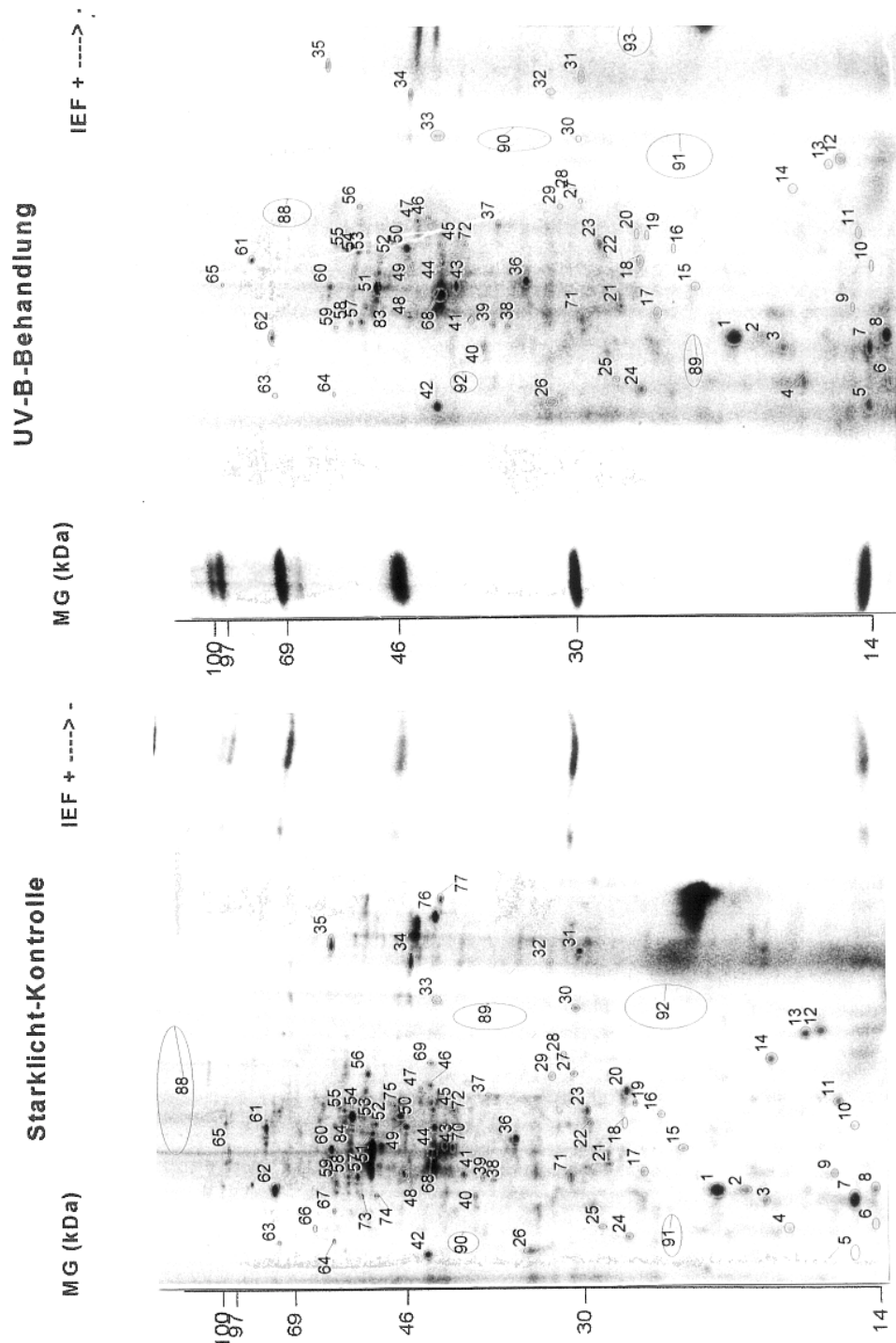


Abb. 16: Autoradiographie der 2D-PAGE Analyse der *in vitro* translatierten poly (A)⁺-RNA isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge. Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, UV-B_{BE} < 0,5 mW m^{-2}) exponiert. Erntezeitpunkt 3 (s. Ernteschema S. 50) wird gezeigt: die Starklicht-Kontrolle (unten) und die entsprechende UV-B-behandelte Probe (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV-B_{BE} 430 mW m^{-2} ; oben). Die *in vitro* Translation der isolierten poly (A)⁺-RNA erfolgte mittels einem Reticulocytensylat und jeweils 500 000 dpm TCA-unlösliche Radioaktivität wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die vergleichbaren Spots sind mit identischen Nummern gekennzeichnet. Die Mittelwerte der Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 88 – wurden zur Hintergrundsermittlung bei der Quantifizierung der *in vitro* translatierten Polypeptide abgezogen.

Ernte 4

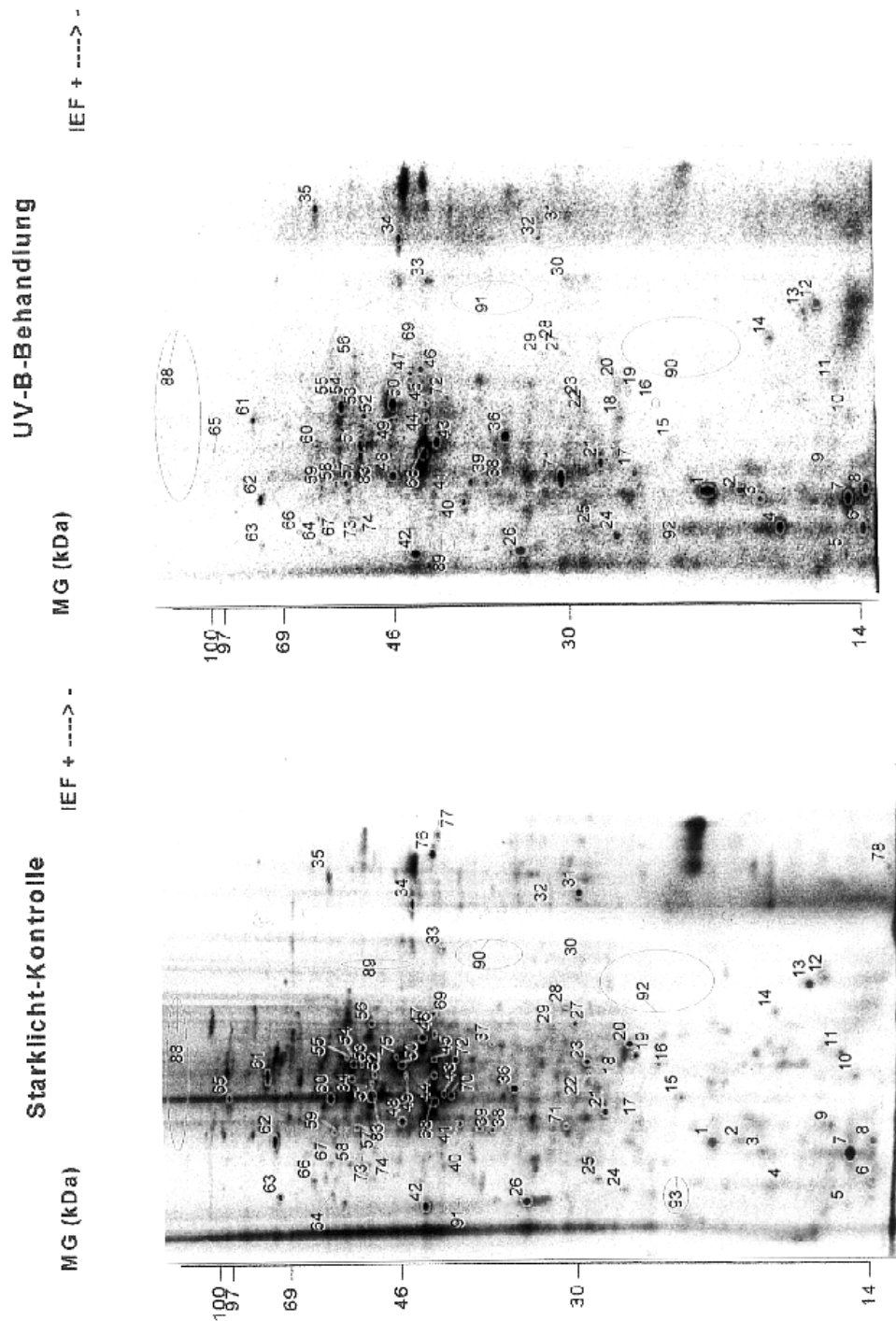


Abb. 17: Autoradiographie der 2D-PAGE Analyse der *in vitro* translatierten poly (A)⁺-RNA isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge. Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, UV-B_{BE} < 0,5 mW m^{-2}) exponiert. Erntezeitpunkt 4 (s. Ernteschema S. 50) wird gezeigt: die Starklicht-Kontrolle (unten) und die entsprechende UV-B-behandelte Probe (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV-B_{BE} 430 mW m^{-2} ; oben). Die *in vitro* Translation der isolierten poly (A)⁺-RNA erfolgte mittels einem Reticulocytenslysate und jeweils 500 000 dpm TCA-unlösliche Radioaktivität wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die vergleichbaren Spots sind mit identischen Nummern gekennzeichnet. Die Mittelwerte der Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 88 – wurden zur Hintergrundermittlung bei der Quantifizierung der *in vitro* translatierten Polypeptide abgezogen.

Ernte 5

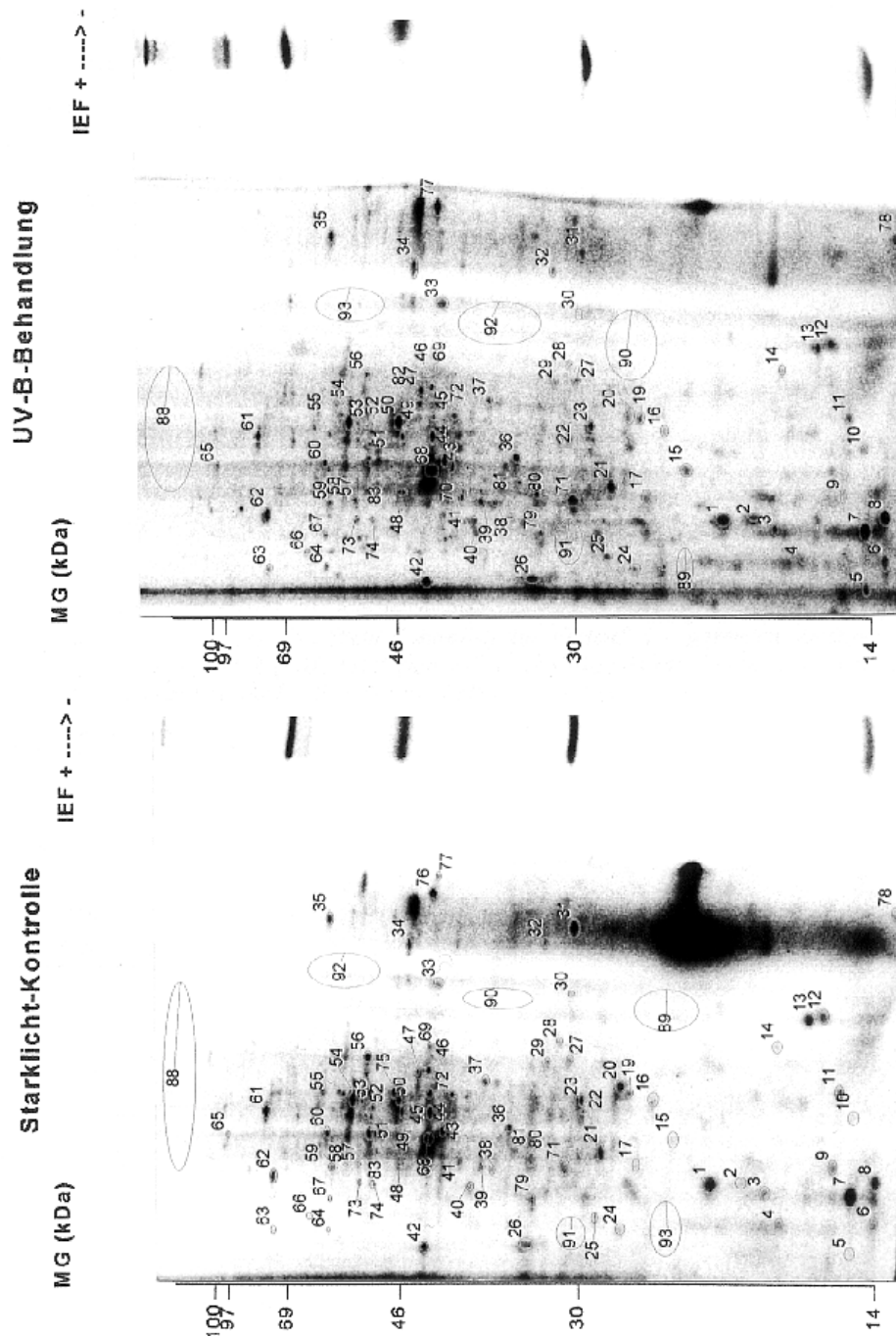


Abb. 18: Autoradiographie der 2D-PAGE Analyse der *in vitro* translatierten poly (A)⁺-RNA isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge. Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, UV-B_{BE} < 0,5 mW m^{-2}) exponiert. Erntezeitpunkt 5 (s. Ernteschema S. 50) wird gezeigt; die Starklicht-Kontrolle (unten) und die entsprechende UV-B-behandelte Probe (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV-B_{BE} 430 mW m^{-2} ; oben). Die *in vitro* Translation der isolierten poly (A)⁺-RNA erfolgte mittels einem Reticulocytensylat und jeweils 500 000 dpm TCA-unlösliche Radioaktivität wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die vergleichbaren Spots sind mit identischen Nummern gekennzeichnet. Die Mittelwerte der Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 88 – wurden zur Hintergrundsermittlung bei der Quantifizierung der *in vitro* translatierten Polypeptide abgezogen.

2.2. UV-B-induzierte bzw. -reprimierte *in vitro* translatierte Proteine im Vergleich zu den entsprechenden Starklicht-Kontrollen

Um die Unterschiede basierend auf UV-B-Exposition ($\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\text{UV-B}_{\text{BE}} 430 \text{ mW m}^{-2}$) aufzuzeigen, wurden die Induktionsfaktoren der einzelnen Proteine unter UV-B-Behandlung im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle ($\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\text{UV-B}_{\text{BE}} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$) betrachtet.

Die erhöhte UV-B-Exposition der Pflanzen lag zum 3. Erntezeitpunkt bei 3 h und zur Ernte 4 bei insgesamt 6 h. Bereits zum Zeitpunkt 3 zeigte sich eine deutliche prozentuale Reduktion der *in vitro* translatierten Proteine um ca. 61% gegenüber der entsprechenden Starklicht-Kontrolle (s. Tab. 12 und Anhang Tab. 33). Nach anhaltender UV-B-Exposition war eine weitere prozentuale Reduktion der *in vitro* translatierten Proteine um ca. 30%, d.h. insgesamt um 90 %, zu sehen. Mit Beenden der UV-B-Exposition pendelte sich ein Gleichgewicht zwischen induzierten und reprimierten Proteinen ein.

Tab. 12: Überblick über die relativen Anteile (%) der *in vitro* translatierten Proteine nach UV-B-Exposition im Vergleich zu den entsprechenden Starklicht-Kontrollen im Verlauf der gesamten Zeitkinetik. Die UV-B-Exposition erfolgte täglich für 6 h ($\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\text{UV-B}_{\text{BE}} 430 \text{ mW m}^{-2}$), insgesamt 12 h. (s. Ernteschema S. 50). Als unverändert wurden Proteine mit Faktoren $< 1,6$ bezeichnet.

Gesamtproteine unter UV-B-Exposition bezogen auf die entsprechende Starklicht-Kontrolle (%)								
Erntezeitpunkt	3	4	5	6	7	8	9	10
Gesamtdauer UV-B-Exposition (h)	(3h UV)	(6h UV)					(9h UV)	(12h UV)
Induziert	12	2,6	21,5	25,9	6,8	69,2	50,7	67,4
Reprimiert	61,3	89,6	34,2	37	54,5	21,2	11	15,2
Unverändert	26,7	7,8	44,3	37	38,6	9,6	28	17,4

Im weiteren Verlauf erreichte die Reduktion der *in vitro* translatierten Proteine einen Wert von 55% (Ernte 7). Am zweiten Versuchstag hingegen zeichnete sich mit Einsetzen der erneuten Lichtperiode im Vergleich zum ersten ein völlig entgegengesetztes Bild ab: mit beginnender PAR-Exposition zeigte sich eine 70%-ige Induktion, welche nach einsetzender UV-B-Behandlung anhielt.

Tab. 12 verdeutlicht, daß zu den ersten beiden Erntezeitpunkten überwiegend Proteine reprimiert wurden, und sich anschließend ein prozentuales Gleichgewicht zwischen induziert, reprimiert und unveränderten Proteinen einstellte. Am zweiten Tag wurde die erneute verstärkte Reprimierung der Proteine durch eine vermehrte Induktion der Transkripte abgelöst.

2.2.1. Induzierte *in vitro* translatierte Proteine zur Ernte 3 (nach 3 h UV-B-Exposition) im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle

9 Proteine lagen bereits nach 3 h UV-B-Exposition induziert vor (s.Tab. 13 und Anhang Tab. 34). 78% von den aufgeführten induzierten Proteinen wurden durch ein $MG \leq 30$ kDa und einem sauren pI-Wert charakterisiert. Protein 3 ($MG = 19,5$ kDa; $pI = 5,1$) zeigte während der ersten 3 h UV-B-Exposition eine Induktion und nach weiteren 3 h eine Reprimierung; mit Beenden der UV-B-Exposition blieb dieses Protein jedoch bis zum 2. Tag unverändert (s. Anhang Tab. 33).

Tab. 13: *In vitro* translatierte Proteine zum Erntezeitpunkt 3 (d.h. nach 3 h erhöhter UV-B-Exposition), die nach UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle induziert wurden. Die MG (kDa) und die pI-Werte (pH-Einheiten) der Proteine sind gruppiert angegeben.

MG-Bereich	saurer pI	neutraler pI
	Protein (n)	Protein (n)
< 30 kDa	7	
30 - 60 kDa		2

2.2.2. Reprimierte *in vitro* translatierte Proteine zum Erntezeitpunkt 3 (d.h. nach 3 h UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle)

46 von 75 (61%) ausgewerteten Proteinen lagen bereits nach 3 h UV-B-Exposition reprimiert vor (s. Tab. 14). Bei der Gruppierung der Proteine entsprechend ihrem pI wurde deutlich, daß 24 Proteine einen sauren, 8 einen basischen und 12 einen neutralen pI trugen. Die Unterteilung der sauren Proteine nach dem MG ergab folgende Gruppierung: 4 Proteine ≤ 30 kDa, $10 \leq 60$ kDa und $10 > 60$ kDa (s. Tab. 14 und Anhang Tab. 35).

Tab. 14: Reprimierte *in vitro* translatierte Proteine zum Erntezeitpunkt 3 nach UV-B-Behandlung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die MG- (kDa) und die pI-Bereiche (pH-Einheiten) der Proteine sind in Gruppen eingeteilt.

MG-Bereich	saurer pI	neutraler pI	basischer pI
	Protein (n)	Protein (n)	Protein (n)
< 30 kDa	3	5	2
30 - 60 kDa	11	8	5
> 60 kDa	10	1	1

2.2.3. Induzierte und reprimierte *in vitro* translatierte Proteine nach 6 h erhöhter UV-B-Bestrahlung im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle (Ernte 4)

Die bereits dargestellten Daten verdeutlichten (s. Tab. 12), daß sich bereits nach 3 und 6 h UV-B-Behandlung gravierende Unterschiede zwischen UV-B-exponierten und Kontroll-Pflanzen abgezeichnet haben.

Nach 6-stündiger UV-B-Exposition lagen lediglich 2 Polypeptide 4 und 5 mit einem sauren pI (4,2 – 4,5) und einem MG von 13,5 bzw. 16,6 kDa induziert vor.

Es wurden insgesamt 79 der quantifizierten Proteine reprimiert (s. Tab. 15 und Anhang Tab. 36). 37 Proteine ließen sich durch einen sauren pI, 33 durch einen neutralen und 9 durch einen basischen charakterisieren. Das MG dieser reprimierten Proteine verteilte sich über alle MG-Gruppen, wobei die Proteine mit einem mittleren MG von 30-60 kDa den größten Anteil einnahmen.

Tab. 15: Reprimierte in vitro translatierte Proteine zum Erntezeitpunkt 4 nach UV-B-Behandlung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die MG- (kDa) und die pI-Bereiche (pH-Einheiten) der Proteine sind in Gruppen eingeteilt.

MG-Bereich	saurer pI	neutraler pI	basischer pI
	Protein (n)	Protein (n)	Protein (n)
< 30 kDa	9	6	3
30 - 60 kDa	17	15	5
> 60 kDa	11	2	1

2.2.4. In vitro translatierte Proteine, die während der ersten 3 h UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle unverändert blieben, aber nach 6 h UV-B reprimiert wurden (Ernte 4)

Es existierten 20 Proteine, die während der ersten 3 h UV-B-Behandlung keiner Veränderung unterlagen, aber nach 6 h UV-B-Exposition (Ernte 4) reprimiert wurden (s. Tab. 16 und Anhang Tab. 37): 2 Proteine trugen einen basischen pI-Wert, 14 Proteine einen sauren und 4 Proteine einen neutralen pI-Wert. Die MG dieser Proteine variierten über den gesamten Bereich. Hingegen gab es keine Proteine, die während der ersten 3-stündigen UV-B-Exposition unverändert blieben und nach 6-stündiger UV-B-Behandlung induziert wurden.

Tab. 16: Induktionsverläufe der reprimierten in vitro translatierten Proteine nach 6-stündiger UV-B-Exposition im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Erntezeitpunkt 4): diese waren zum Erntezeitpunkt 3 unverändert und zum Erntezeitpunkt 4 reprimiert. Die Proteine sind entsprechend dem MG (kDa) und dem pI-Wert (pH-Einheiten) gruppiert.

MG-Bereich	saurer pI	neutraler pI	basischer pI
	Protein (n)	Protein (n)	Protein (n)
< 30 kDa	5		1
30 - 60 kDa	7	3	1
> 60 kDa	2	1	

2.2.5. Zum Erntezeitpunkt 5 in vitro translatierte Proteine im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle

Die Induktionsverläufe dieser Transkripte variierten. Es gab Transkripte, die während der 6-stündigen UV-B-Behandlung reprimiert vorlagen und anschließend erstmals keine weitere

Veränderung aufzeigten (s. Tab. 17 und Anhang Tab. 38). Diese Proteine, die während der UV-B-Exposition reprimiert wurden und deren Induktionsverhalten nach Beenden der ersten UV-B-Expositionsphase im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle unverändert blieben, sind in Tab. 17 separat dargestellt. 12 der 18 Proteine ließen sich durch einen sauren pI-Wert charakterisieren, mit gleichwertiger Verteilung der Proteine über den MG-Bereich.

Tab. 17: In vitro translatierte Proteine zum Erntezeitpunkt 5, die zum Erntezeitpunkt 3 und 4 reprimiert wurden und nach Beenden der ersten UV-B-Expositionsphase im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle unverändert blieben. Diese wurden in Gruppen unterteilt entsprechend dem MG (kDa) und pI-Wert (pH-Einheiten).

MG-Bereich	saurer pI	neutraler pI	basischer pI
	Protein (n)	Protein (n)	Protein (n)
< 30 kDa	2	1	1
30 - 60 kDa	5	1	1
> 60 kDa	5	1	1

Das Protein 4 (16,6 kDa; pI 4,5) hingegen wurde während der 6-stündigen UV-B-Exposition induziert und anschließend reprimiert (Ernte 5). Protein 5 (13,5 kDa; pI 4,2) lag während der Ernten 3, 4 und 5 stets induziert vor (s. Anhang Tab. 33).

7 saure Proteine mit einem MG zwischen 45,7 und 77,6 kDa wurden während der ersten 6 h UV-B-Exposition reprimiert und anschließend induziert (Ernte 5): Proteine 57, 58, 62, 64, 67, 70 und 73 (s. Anhang Tab. 33).

2.2.6. In vitro translatierte Proteine nach UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle, die zu den Erntezeitpunkten 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 induziert oder reprimiert wurden

Die Translationsrate einiger Proteine lag erst zu späteren Erntezeitpunkten induziert oder reprimiert vor:

5 Proteine zeigten erst zur Ernte 6 einen Unterschied im Vergleich zur Starklicht-Kontrolle: Protein 71 (32 kDa; pI = 5,3), 76 (49 kDa; pI=9,9), 80 (35,9 kDa; pI = 5,5), 81 (37,3 kDa; pI = 5,7) und 82 (45,7 kDa; pI = 9,1). Nach UV-B-Exposition induziert zeichneten sich gegenüber der Kontrolle die Proteine 71, 80 und 81 ab und als reprimiert die Proteine 76 und 82. Die Proteine 69 und 75 wurden am ersten Tag reprimiert und am 2. Tag (Ernte 7) nicht mehr nachgewiesen. Protein 40 - mit einem MG von 40,4 kDa und einem pI von 5 - änderte sich erst am 2. Tag (Ernte 7); dieses Protein charakterisierte die anfängliche Reprimierung gefolgt von der anschließenden Induktion.

Auffällig war, daß Protein 2 während der Erntezeitpunkte 3 und 4 reprimiert wurde und anschließend bis zum Versuchsende unverändert blieb.

Protein 77 lag lediglich zum Erntezeitpunkt 5 vor. Im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle wurde Protein 77 nach der UV-B-Exposition um Faktor 9,9 induziert. Dieses Protein ist somit ein UV-B-induziertes Protein.

Protein 79 konnte nur zu den Erntezeitpunkten 5 und 6 nachgewiesen werden und wurde nach UV-B-Exposition im Vergleich zur Kontrolle reprimiert; dieses Protein ist folglich UV-B reprimiert.

2.2.7. Neue und nicht mehr nachweisbare *in vitro* translatierte Proteinspots durch erhöhte UV-B-Exposition

Der Tab. 18 sind alle Zeitpunkte zu entnehmen, zu denen die Proteine nach UV-B-Exposition bezogen auf die entsprechende Starklicht-Kontrolle neu gebildet oder nicht mehr nachgewiesen wurden. Diese Unterschiede zeigten sich nur zu bestimmten Zeitpunkten während der Kinetik.

Aus Tab. 18 wird deutlich, daß es sich bei den insgesamt 8 neu vorhandenen *in vitro* translatierten Proteinen nach UV-B-Exposition bezogen auf die entsprechende Kontrolle um 6 saure Proteine handelt. Insbesondere zur Ernte 6 wurden im Vergleich zur Starklicht-Kontrolle 6 neue Proteine gebildet. Zu diesem Zeitpunkt hatte eine bereits 6-stündige UV-B-Exposition der Pflanzen mit einer anschließenden Weiterkultivierung von jeweils 4 h unter Starklicht und 4 h im Dunkeln stattgefunden (s. Ernteschema S. 50)

Ebenso gibt es 12 Proteine, die im Laufe der Zeitkinetik bei UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle nicht mehr detektierbar sind: 5 saure, 5 basische und 2 neutrale Proteine. Desweiteren ist auffällig, daß zu den Erntezeitpunkten 3 und 8 der Zeitkinetik jeweils 5 Proteine nicht mehr vorliegen.

Andererseits existieren aber auch Proteine, die nach anfänglicher UV-B-Exposition im Vergleich zur Starklicht-Kontrolle verschwinden und im weiteren Verlauf gegenüber der Starklicht-Kontrolle wieder detektierbar sind: von insgesamt 6 Proteinen zeichnen sich 4 durch einen sauren pI aus. Die Proteine werden nach 3 und 6 h UV-B (Ernte 3 und 4) reprimiert und ausschließlich zum Erntezeitpunkt 9 (UV-B-Gesamtdauer 9 h) neu gebildet.

Tab. 18: Zusammenfassung der nach UV-B-Exposition neu gebildeten oder gegenüber der Starklicht-Kontrolle fehlenden *in vitro* translatierten Proteinspots bezogen auf die entsprechende Starklicht-Kontrolle zu den entsprechenden Erntezeitpunkten.

MG	pI	Spot	Erntezeitpunkte						
			Ernte 3	Ernte 4	Ernte 5	Ernte 6	Ernte 7	Ernte 8	Ernte 9
13,5	4,2	5	neu			neu			
76,7	4,2	63				neu			
16,6	4,5	4				neu			neu
37,3	5,7	81				neu			neu
23,3	6	15				neu			
27,7	6,25	18				neu			
59,6	6,55	53							neu
45,7	9,1	82							neu
69,2	4,7	66	fehlt						
56,9	5	74	fehlt						
25,8	5,5	17						fehlt	
35,9	5,5	80							fehlt
45,7	5,95	70	fehlt	fehlt					
55	6,65	75	fehlt	fehlt	fehlt				
48,8	7,45	69	fehlt						
16	7,9	13						fehlt	
46,8	8,4	33						fehlt	
34,5	9,1	32						fehlt	
51,5	9,1	34						fehlt	
12,9	9,5	78		fehlt		fehlt			
65,3	4,75	67	fehlt						neu
59,6	5	73	fehlt						neu
90,8	5,95	65		fehlt					neu
62,4	6,3	84	fehlt	fehlt					neu
40,9	6,9	37		fehlt					neu
32	8,3	30				fehlt			neu

2.2.8. Zusammenfassung der nach UV-B-Exposition *in vitro* translatierten Proteine im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle

Die Zusammenfassung der Daten ergibt, daß eindeutig vermehrt Proteine reprimiert wurden: frühe Effekte waren bereits nach 3 h UV-B-Exposition durch eine 61%-ige Abnahme der Transkripte zu erkennen. Nach 6 h UV-B-Exposition erfolgte eine weitere Reprimierung der Transkripte (insgesamt 90%).

Die nach 3 und 6 h erhöhter UV-B-Exposition reprimiert vorliegenden Proteine - unabhängig davon, ob sie sich anschließend änderten – zeichneten sich überwiegend durch einen sauren pI aus.

Nach 3 h UV-B-Exposition induziert vorliegende Proteine ließen sich meist durch ein MG < 30 kDa verbunden mit einem pI im sauren Bereich charakterisieren (s. Tab. 13).

Mit Beenden der UV-B-Exposition (6 h) lag ein nahezu ausgewogenes Verhältnis der Anteile zwischen induzierten und reprimierten Transkripten vor (Ernte 5, s. Tab. 12).

Zum Erntezeitpunkt 7 zeichnete sich erneut eine vermehrte Repression ab (s. Tab. 12).

Die Effekte am zweiten Tag waren mit einsetzender Beleuchtung (Ernte 8) genau entgegengesetzt: zuerst erfolgte eine 70%-ige Induktion der Transkripte, die während der anschließenden, wiederholten UV-B-Exposition anhielt.

2.3. Tageszeitliche Änderungen der mRNA-Transkripte unter Starklicht-Exposition bezogen auf den Starklicht-Nullwert

Für diese prozentualen Berechnungen dienten die Werte der Proteine zum Erntezeitpunkt 1 unter Starklicht-Exposition als Bezugswert. Dadurch konnten die tageszeitlich bedingten Veränderungen der Transkripte unter Starklicht-Exposition im Verlauf dargestellt werden (s. Tab. 19 und Anhang Tab. 39).

Tab. 19: Relative Anteile (%) der induzierten, reprimierten und unveränderten mRNA-Transkripte unter Starklicht-Exposition ($PAR\ 1300\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$; $UV-B_{BE} < 0,5\ mW\ m^{-2}$) im tageszeitlichen Verlauf; die Erntezeitpunkte und die während der verschiedenen Erntezeiten vorhandenen Lichtstufen ($LS\ I + II = PAR\ 1300\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$; $UV-B_{BE} < 0,5\ mW\ m^{-2}$) sind ebenso der Tabelle zu entnehmen (s. Ernteschema S. 72). Lagen die Induktions- und Repressionsfaktoren $< 1,6$, dann wurden diese Proteine als unverändert bezeichnet.

In vitro translatierte Proteine unter Starklicht-Exposition im tageszeitlichen Verlauf (%)									
Erntezeitpunkt	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Induziert	36,4	10,4	79,7	27,2	34,6	24,4	7,7	9,2	8,7
Reprimiert	10,4	49,4	3,8	14,8	28,4	35,9	78,8	73,7	71,7
Unverändert	53,2	40,3	16,5	58	37	39,7	13,5	17,1	19,6

Wie in der Tab. 19 zu sehen ist, zeigten zur Ernte 3 50% der quantifizierten Transkripte eine Reprimierung. Zum Erntezeitpunkt 4 hingegen wurden vermehrt Proteine induziert (80% der erfaßten Proteine). Am Abend des 1. Tages (Ernte 5) lagen die induzierten und reprimierten Transkripte zu vergleichbaren Anteilen vor. Dieses Gleichgewicht zwischen induzierten und reprimierten Transkripten hielt bis zum 2. Tag an. Zum Erntezeitpunkt 8 wurden 79% der Transkripte erneut reprimiert; was bis zum Versuchsende (Ernte 10) unverändert blieb. Die vorliegenden Daten zeigten am 1. Versuchstag die überwiegende Induktion der *in vitro* translatierten Proteine und am zweiten Versuchstag eine vorwiegende Reprimierung dieser.

2.3.1. Neuinduzierte *in vitro* translatierte Proteine während der Starklicht-Exposition im gesamten Verlauf

Translatierte Proteine, die im Starklicht-Tagesgang im Vergleich zum Zeitpunkt 0 neu gebildet wurden, sind in der Tab. 20 zusammengefaßt.

Es gab 12 Starklicht-induzierbare Proteine, die im Tagesgang neu entstanden (s. Tab. 20). Der pI lag bei 8 translatierten Proteinen im sauren Bereich und bei 4 im basischen pH-Bereich. Die Proteine ließen sich bezüglich ihres MG in Klassen unterteilen: 4 kleine Proteine (MG < 30 kDa), 7 mittlerer Größe (30 - 60 kDa) und 1 mit einem MG > 60 kDa. Die Polypeptide 79 und 81 lagen am zweiten Versuchstag nicht mehr vor. Zum Erntezeitpunkt 9 wurden 3 Proteine transient neu induziert, nämlich Protein 85 (39,3 kDa; pI = 6,1), 86 (15,7 kDa; pI = 5) und 87 (14,9 kDa; pI = 5), die unter anhaltender Starklicht-Exposition wieder verschwanden.

Protein 18 blieb zum Erntezeitpunkt 2 unbeeinflusst und zeigte erst zum Erntezeitpunkt 3 eine Induktion. Protein 78 wurde vom Erntezeitpunkt 4 bis zur Ernte 7 nachgewiesen.

Desweiteren gab es drei Proteine, die zur Ernte 5 neu gebildet wurden: Proteine 79 (35,1 kDa, pI = 4,8), 80 (35,9 kDa; pI = 5,5) und 81 (37,3 kDa; pI = 5,7). Protein 81 lag aber nur zu diesem Zeitpunkt vor.

Das Polypeptid 82 - mit einem MG von 45,7 kDa und einem pI von 9,1 - wurde zum Erntezeitpunkt 6 neu induziert.

Tab. 20: *In vitro* translatierte Proteine, die während des Tagesganges unter Starklicht-Exposition ($PAR\ 1300\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$; $UV-B_{BE} < 0,5\ mW\ m^{-2}$) neu gebildet wurden; die MG sind in kDa und die pI -Werte in pH-Einheiten angegeben.

Protein	pI	kDa	Zeitpunkte			
			Tag 1 (MEZ)	Erntezeitpunkt	Tag 2 (MEZ)	Erntezeitpunkt
18	6,25	27,7	13h - 16h	3-4	6h - 16h	7-10
31	9,2	31,8	10h - 24h	2-6	6h , 16h	7, 10
32	9,1	34,5	10h - 24h	2-6	6h - 10h	7-8
78	9,5	12,9	16h - 24h	4-6	6h	7
79	4,8	35,1	20h - 24h	5-6		
80	5,5	35,9	20h - 24h	5-6	13h	9
81	5,7	37,3	20h	5		
82	9,1	45,7	24h	6	6h	7
84	6,3	62,4	10h -16h, 24h	2-4, 6	6h	7
85	6,1	39,3			13h	9
86	5	15,7			13h	9
87	5	14,9			13h	9

2.3.2. Induzierte *in vitro* translatierte Proteine nach 4 h Starklicht-Exposition (Ernte 2)

Polypeptide, die aufgrund der Starklicht-Behandlung bereits zum Erntezeitpunkt 2 induziert wurden, sind in Tab. 21 abgebildet. Die MG dieser Proteine erstreckten sich über einen Bereich von 13,6 bis 90,8 kDa, wobei die Mehrzahl zwischen 30 und 60 kDa lag. Der pI-Bereich variierte zwischen 4,2 bis 9,9: davon zeichneten sich 14 Proteine durch einen sauren pI, 9 durch einen neutralen und 5 durch einen basischen aus (s. Anhang Tab. 40).

Tab. 21: Zum Erntezeitpunkt 2 ($PAR\ 1300\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$; $UV-B_{BE} < 0,5\ mW\ m^{-2}$) induziert vorliegende *in vitro* translatierte Proteine unter Starklicht-Exposition bezogen auf den Starklicht-Nullwert. Die MG- (kDa) und die pI-Bereiche (pH-Einheiten) der Proteine sind in Gruppen unterteilt.

MG-Bereich	saurer pI	neutraler pI	basischer pI
	Protein (n)	Protein (n)	Protein (n)
< 30 kDa	1	2	
30 - 60 kDa	7	6	4
> 60 kDa	6	1	1

2.3.3. Reprimierte *in vitro* translatierte Proteine nach 4 h Starklicht-Exposition (Ernte 2)

Tab. 22 zeigt zahlreiche Transkripte, die zum Erntezeitpunkt 2 reprimiert wurden. 7 der insgesamt 8 reprimiert vorliegenden Proteine hatten einen sauren pI. Das MG von 6 Polypeptiden lag unter 20 kDa (s. Anhang Tab. 41).

Tab. 22: Zum Erntezeitpunkt 2 ($PAR\ 1300\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$; $UV-B_{BE} < 0,5\ mW\ m^{-2}$) reprimierte *in vitro* translatierte Proteine während des Starklicht-Tagesganges. Die Proteine sind entsprechend dem MG (kDa) und dem pI-Wert (pH-Einheiten) gruppiert.

MG-Bereich	saurer pI	neutraler pI
	Protein (n)	Protein (n)
< 30 kDa	6	
30 - 60 kDa	1	1

2.3.4. Induzierte *in vitro* translatierte Proteine nach 7 h Starklicht-Exposition (Ernte 3)

Zum Erntezeitpunkt 3 veränderte sich das Translationsmuster dahingehend, daß 39 Proteine reprimiert und 8 induziert wurden (s. Tab. 23 und Anhang Tab. 42). Auffällig dabei war, daß der pI dieser induzierten Transkripte im sauren oder basischen Bereich lag.

Tab. 23: *In vitro* translatierte Proteine, die zum Erntezeitpunkt 3 ($PAR\ 1300\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$; $UV-B_{BE} < 0,5\ mW\ m^{-2}$) im tageszeitlichen Verlauf induziert wurden. Die MG (kDa) und pI -Werte (pH-Einheiten) der Proteine sind in Gruppen eingeteilt.

MG-Bereich	saurer pI Protein (n)	basischer pI Protein (n)
< 30 kDa	2	
30 - 60 kDa		3
> 60 kDa	3	

2.3.5. Induzierte und reprimierte *in vitro* translatierte Proteine nach 10 h Starklicht-Exposition (Ernte 4)

Bei den Proteinen, deren Translationsmuster anfänglich unbeeinflusst blieb und sich zum Erntezeitpunkt 4 änderte, zeichnete sich die Dominanz der überwiegend induziert vorliegenden ab (s. Tab. 24 und Anhang Tab. 43). 10 dieser induzierten Polypeptide trugen einen sauren pI, 3 einen neutralen und weitere 3 einen basischen. Lediglich 1 Protein mit einem pI im basischen Bereich und einem MG bei 32 kDa lag zur Ernte 4 reprimiert vor.

Tab. 24: *In vitro* translatierte Proteine, deren Translationsmuster anfangs unverändert blieb und zum Erntezeitpunkt 4 ($PAR\ 1300\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$; $UV-B_{BE} < 0,5\ mW\ m^{-2}$) während des Tagesganges induziert (links) oder reprimiert (rechts) wurden. Die MG-Bereiche (kDa) und die pI -Werte (pH-Einheiten) der Proteine sind gruppiert angegeben.

pI-Bereich	Induziert Protein (n)	Reprimiert Protein (n)
sauer	10	
neutral	3	
basisch	3	1

2.3.6. Neue und nicht mehr nachweisbare *in vitro* translatierte Proteinspots nach Starklicht-Exposition im Tagesgang

Diese Proteine wurden nur zu den aus der Tabelle ersichtlichen Zeitpunkten im Vergleich zur Starklicht-Kontrolle entweder neu gebildet oder nicht mehr nachgewiesen.

12 *in vitro* translatierte Proteine wurden nach Starklicht-Exposition im Tagesgang zu verschiedenen Zeitpunkten der Kinetik neu gebildet. Die Einteilung der 12 neu gebildeten Proteine erfolgte in 8 saure und 4 basische Proteine (s. Tab. 25). Hingegen lagen 16 *in vitro* translatierte Proteine zu einigen Zeitpunkten der Kinetik nicht mehr vor. Diese 16 Proteine ließen sich in 1 basisches Protein, 11 saure und 4 neutrale Proteine unterteilen (s. Tab. 25).

Tab. 25: Zusammenfassung der im Tagesgang unter Starklicht-Exposition neu gebildeten und nicht mehr nachweisbaren *in vitro* translatierten Proteinspots zu den entsprechenden Erntezeitpunkten.

[illegible]

3. Isolierte Klone mittels der DDRT-PCR nach erhöhter UV-B-Behandlung

Wie anhand der 2D-PAGE der *in vitro* translatierten Proteine gezeigt wurde, erfolgte die Initiierung der Induktion und Repression bereits nach 3 h erhöhter UV-B-Exposition (UV-B_{BE} 430 mW m⁻²; PAR 1300 µmol m⁻² s⁻¹) gegenüber der entsprechenden Starklicht-Kontrolle (UV-B_{BE} < 0,5 mW m⁻²; PAR 1300 µmol m⁻² s⁻¹); dies war noch nach 6 h zu sehen (s. Tab. 12). Als Ursache für diese Effekte kann die stomatäre Leitfähigkeit ausgeschlossen werden. Bereits 1990 beobachteten Sullivan & Teramura, daß die UV-B-Strahlung unter hohen PAR-Intensitäten keine Veränderung der stomatären Leitfähigkeit bewirkte.

Zur Charakterisierung der nach UV-B-Exposition veränderten Transkripte wurde die RNA der exponierten Blätter nach 3 h und 6 h Behandlung im Verhältnis 1:1 für die DDRT-PCR eingesetzt. Als Kontrolle diente die RNA der jeweiligen Starklicht-Kontrolle (s. Abb. 20).

3.1. Optimierung und Durchführung der DDRT-PCR

Die Durchführung der PCR nach Bauer et al. (1993) erzielte anfänglich im Idealfall nur wenige PCR-Produkte (Abb. 19). Aus diesem Grund wurden verschiedene PCR-Parameter variiert, unter anderem die MgCl₂-Konzentration, die dNTP-Konzentration und das Enzym. Zu hohe Konzentrationen von MgCl₂ und dNTP im PCR-Ansatz erhöhten den Hintergrund auf dem Autoradiogramm.

Die Abb. 19 zeigt die PCR durchgeführt mit zwei verschiedenen PCR-Enzymen. Erst das Einsetzen des ExpandTM High Fidelity PCR Systems führte zu einer erfolgreichen PCR (s. Abb. 20). Im Gegensatz zu Bauer et al. (2,5 Units; 1993) waren für eine optimale Amplifizierung 0,5 Units des ExpandTM High Fidelity PCR Systems ausreichend.

Der bedeutendste Parameter für die Optimierung der DDRT-PCR lag eindeutig in der Wahl des Enzyms. Durch Verwendung des ExpandTM High Fidelity PCR Systems wurden erste PCR-Produkte amplifiziert und deren Anzahl durch die Optimierung anderer PCR-Parameter erhöht.

Die Bezeichnung der Klone erfolgte nach folgendem Schema: Amplifikate, die nach UV-B-Behandlung im Vergleich mit der entsprechenden Starklicht-Kontrolle gebildet wurden, trugen die Bezeichnung „UV-I“ - für UV-B-induziert - und im umgekehrten Falle „UV-R“ - für UV-B-reprimiert. Anschließend folgten die Nummern der in die PCR eingesetzten Primer - zuerst der Downstream-, dann der Upstream-Primer (s. II.9.2.). Da jede durchgeführte DDRT-PCR mehrere induzierte Transkripte lieferte, wurden diese nummeriert (= letzte Zahl der Klon-Bezeichnung): z.B. UV-I 1/28-2.

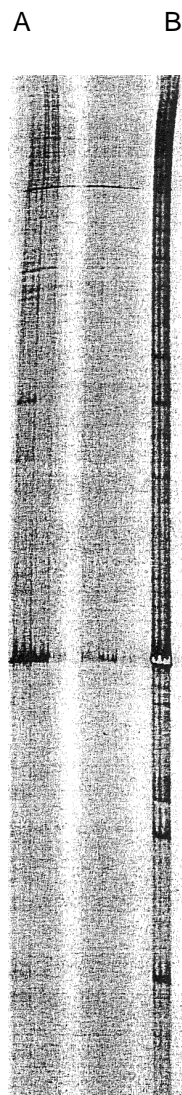


Abb. 19: PCR durchgeführt an Buchen-Kontroll-RNA mit verschiedenen PCR-Enzymen: Ampli-Taq® DNA-Polymerase (A), Expand™ High Fidelity PCR System.

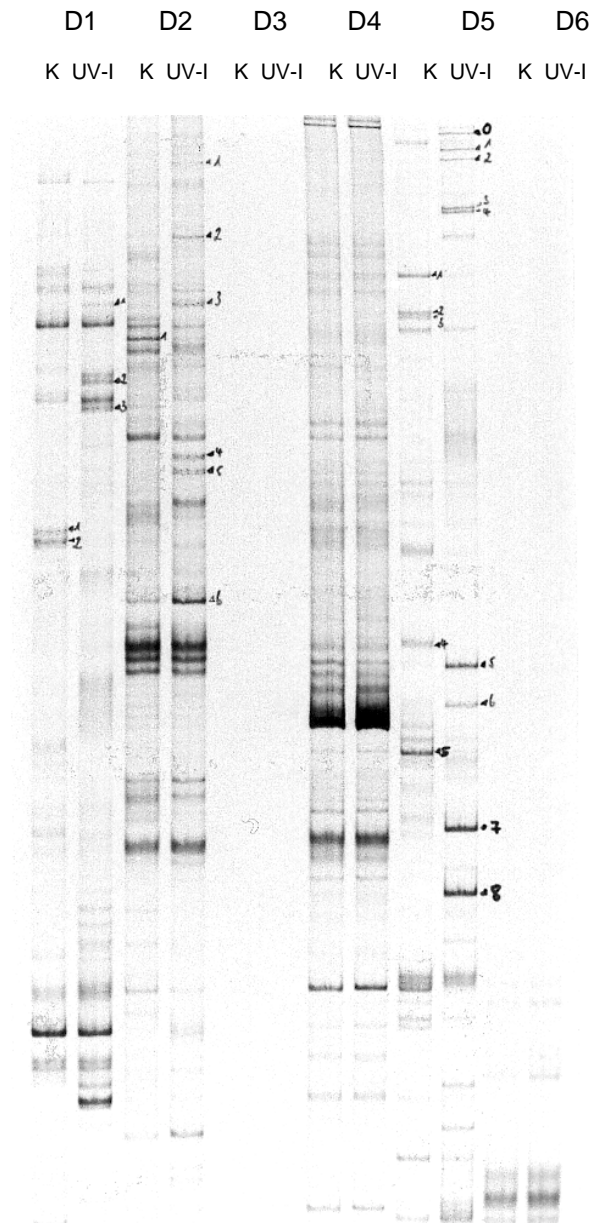


Abb. 20: Differentielles Display durchgeführt mit UV-B-induzierten bzw. -reprimierten mRNAs isoliert aus Blättern von 10-wöchigen Buchensämlingen. Spuren gekennzeichnet mit K(=UV-R) enthalten PCR-Produkte von Buchensämlingen, die unter Starklicht ($UV-B_{BE} < 0.5 \text{ mW m}^{-2}$) exponiert wurden. Mit "UV-I" markierte Spuren kennzeichnen PCR-Produkte von Buchensämlingen nach 3 und 6 h (Mischprobe) erhöhter UV-B-Exposition ($UV-B_{BE} 430 \text{ mW m}^{-2}$). Die nummerierten Banden zeigen die UV-B-induzierten bzw. -reprimierten Transkripte. Es wurden verschiedene dT_{11} MN-Primer (D1-D6) verwendet (Bauer et al., 1993).

Mit Hilfe des modifizierten Differentiellen Displays wurden UV-B-induzierte bzw. -reprimierte Transkripte der Buche isoliert. Die Zahl der isolierten Transkripte lag bei ca. 80 mit einer Größe von 280 bis 620 Basenpaaren (bp) - 29 Transkripte davon waren reprimiert und 50 induziert. Größere Transkripte (30), die nach der 2. PCR-Runde nur eine Amplifikationsbande lieferten (s. Abb. 21), wurden kloniert, mittels PCR überprüft (s. Abb. 22) und sequenziert.

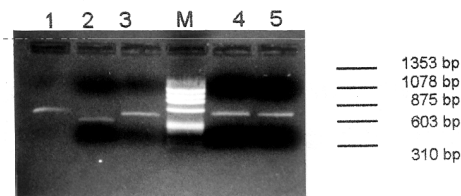


Abb. 21: DDRT-PCR-Amplifikate nach 3 und 6 h (Mischprobe) erhöhter UV-B-Exposition, die zur Vermehrung des Amplifikates und Kontrolle das 2. Mal in eine PCR eingesetzt wurden. Die Verifizierung erfolgte mit den identischen Primern in der PCR. Die Größenbestimmung der PCR-Amplifikate (1-5) fand auf einem 1,5%-igen TAE-Agarosegels mit einem DNA-Größenmarker M statt (DNA Marker V, AGS: 1353, 1078, 875, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 und 72 bp).

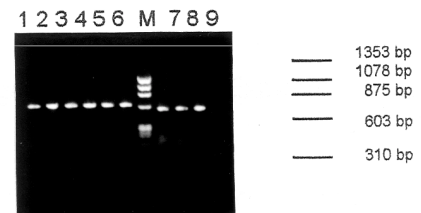


Abb. 22: Überprüfen der Kolonien mittels PCR und DDRT-PCR-Primern. Es wurden je Transformationsansatz 3 Kolonien über die PCR getestet. Die Größenbestimmung der PCR-Amplifikate (1-9) erfolgte elektrophoretisch auf einem 1,0 %-igen TBE-Agarosegels mit einem DNA-Größenmarker M (DNA Marker V, AGS: 1353, 1078, 875, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 und 72 bp).

3.2. Vorselektion möglicher positiver Klone

Um mögliche Artefakte basierend auf der Methode des Differentiellen Displays auszuschließen, ist die Bestätigung der isolierten Klone über die Northern-Blot Analyse notwendig. Die schnelle Vorselektion der differentiellen Klone fand mittels einer Dot-Blot Hybridisierung nach Vögeli-Lange et al. (1996) statt (s. II.15.1.). Klone, die in der durchgeführten Dot-Blot Analyse hybridisierten, wurden bevorzugt für die anschließende Northern-Blot Analyse eingesetzt.

Die Quantifizierung der RNA ergab den Hinweis, daß möglicherweise folgende Klone artefaktfreie Differentielle Display Klone sein könnten: UV-I 1/28-2; UV-I 5/29-2; UV-I 12/28-4 und UV-R 2/28-1. Die so ermittelten Klone wurden vor der Sequenzierung zur erneuten Bestätigung der Northern-Blot Analyse unterzogen.

Da die Northern-Blot Analyse im Vergleich zur Reversen Transkriptase-PCR wesentlich unempfindlicher ist, werden Transkripte mit geringer Kopienanzahl nicht erfaßt.

3.3. Effekte anhand der Northern-Blot Analysen

Die Durchführung der Northern-Blot Analyse (s. Anhang Abb. 59) erfolgte sowohl mit den mittels der Dot-Blot Hybridisierung ermittelten Klonen (s. III.3.2.) als auch mit 4 weiteren Klonen (UV-I 1/28-1; UV-R 1/28-1; UV-R 10/28-1 und UV-R 12/28-1), deren Sequenzen im Datenbankvergleich Ähnlichkeiten mit bereits beschriebenen Motiven aufwiesen.

Aus Material- und Zeitgründen wurden die Untersuchungen auf Northern-Blot Ebene nicht wiederholt.

Die Erntezeitpunkte mit den verschiedenen Lichtbedingungen während der Experimente E 3 und E 4 sind auf S. 50 (s. Abb. 14) dargestellt.

Die Quantifizierung der RNA in den Northern-Blot Analysen fand mittels des Phosphorimagers (Fuji) statt; die Untersuchung mittels des Phosphorimagers gewährleistet eine lineare Beziehung der Schwärzung und der eingebauten Radioaktivität. Bezugspunkt für die Quantifizierung der RNA in den Northern-Blot Analysen war jeweils die 1. Ernte.

3.3.1. Klon in Abhängigkeit von erhöhter UV-B-Exposition

Die Pflanzen wurden täglich 6 h erhöhter UV-B-Strahlung ($UV-B_{BE}$ 430 $mW\ m^{-2}$ in E 4, $UV-B_{BE}$ 360 $mW\ m^{-2}$ in E 8 und $UV-B_{BE}$ 285 $mW\ m^{-2}$ in E 9) ausgesetzt. Im zeitlichen Verlauf wurden die Pflanzen unter Starklicht (PAR 1300 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$; $UV-B_{BE} < 0,5\ mW\ m^{-2}$) exponiert und unterlagen dem Tag-Nacht-Rhythmus (s. Anhang Tab. 44).

Da die Quantifizierung der Hybridisierungssignale mittels des Phosphorimagers (s.o.) erfolgte, sind die erhaltenen Induktions- und Repressionsfaktoren abgesichert.

Eine transiente Induktion zeigte das Transkript des Klons UV-I 1/28-1 unter erhöhter UV-B-Exposition. Aus der 6-stündigen erhöhten UV-B-Exposition resultierte eine Induktion um Faktor 3,6 und im weiteren Verlauf eine Reprimierung auf die ursprüngliche Transkriptmenge (s. Abb. 25).

Mit einer induzierten Transkriptionsrate nach erhöhter UV-B-Behandlung ($UV-B_{BE}$ 430 $mW\ m^{-2}$) im zeitlichen Verlauf reagierte das Transkript des Klons UV-I 12/28-4 (E 4, s. Abb. 25). Das Induktionsoptimum lag beim Erntezeitpunkt 7 mit einer Induktion um Faktor 5,2.

Eine transiente Induktion um den Faktor 3,8 zeigte die Boten-RNA des Klons UV-I 1/28-2 zum Erntezeitpunkt 5 (s. Abb. 25); im weiteren zeitlichen Verlauf wurde das Transkript dieses Klons reprimiert.

Die mRNA des Klons UV-R 1/28-1 zeichnete sich nach 6-stündiger erhöhter UV-B-Exposition ($UV-B_{BE}$ 285 $mW\ m^{-2}$), also zum Erntezeitpunkt 4, durch eine Induktion und im weiteren Verlauf durch einen kontinuierlichen Anstieg dieser bis zum Erntezeitpunkt 6 um Faktor 12 aus (s. Abb. 23 und 24). Die Transkriptionsrate wurde durch die wiederholte 6-stündige UV-

B-Exposition (Ernte 7 und 9) im zeitlichen Verlauf nicht mehr zusätzlich induziert und nahm sogar zum Erntezeitpunkt 10 um Faktor 9 ab.

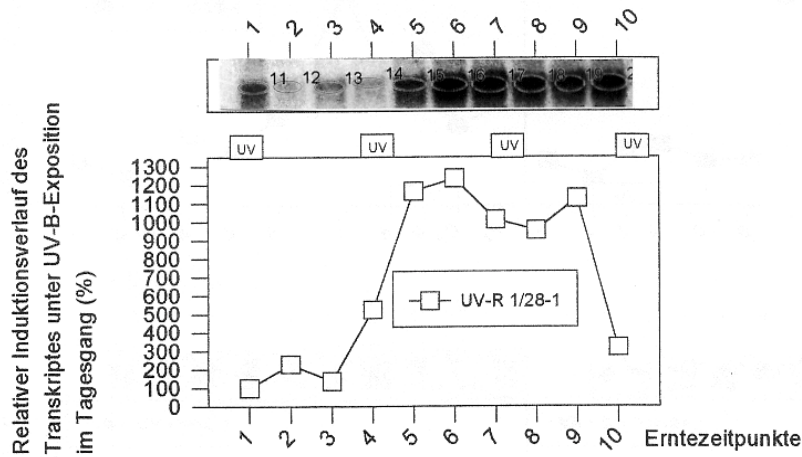


Abb. 23: Die Kinetik des mRNA-Transkriptes UV-R 1/28-1 unter erhöhter UV-B-Exposition ($UV-B_{BE}$ 285 $mW m^{-2}$ in E 9) ausgedrückt in relativen Hybridisierungssignalen. Es wurde die RNA aus Mischproben isoliert (E 9 $n=10-12$) und für die Northern-Blot Analyse eingesetzt. Die Pflanzen wurden täglich 6 h unter erhöhtem UV-B exponiert (s. Ernteschema Abb. 24).

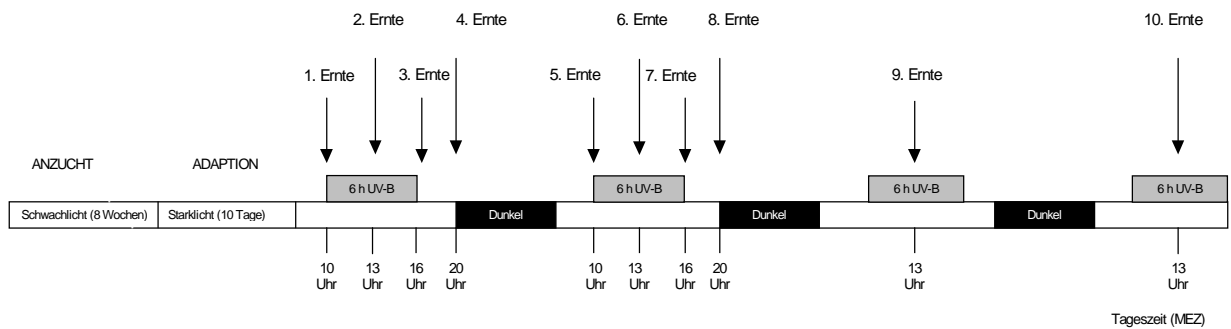


Abb. 24: Erntezeitpunkte mit den verschiedenen Lichtbedingungen während des Experimentes E 9. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Primärblätter geerntet. Die Exposition der Pflanzen erfolgte während der Lichtperiode unter Starklicht (PAR 1300 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$; $UV-B_{BE} < 0,5 mW m^{-2}$) und die UV-B-Behandlung täglich 6 h (PAR 1300 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$; $UV-B_{BE}$ 285 $mW m^{-2}$).

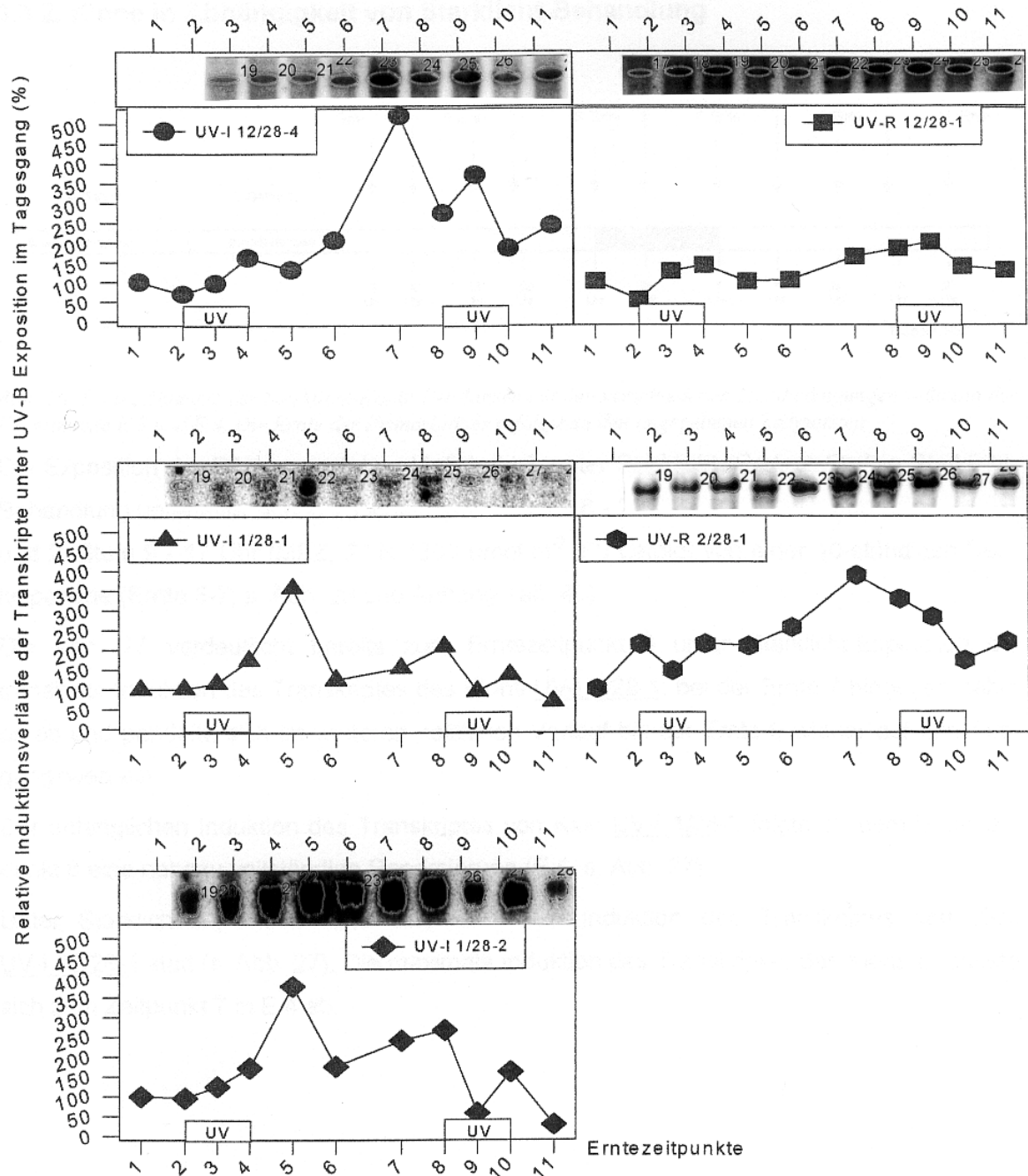


Abb. 25: Relative Anteile (%) von 5 verschiedenen Transkripten unter erhöhter UV-B-Exposition ($UV-B_{BE}$ 430 mW m^{-2}) aus E 4. Die isolierte RNA stammte aus Mischproben ($n=6$) und wurde für die Northern-Blot Analyse eingesetzt. Die erhöhte UV-B-Exposition der Pflanzen fand täglich 6 h statt (s. Ernteschema S. 50). Hier nicht aufgeführte Kontroll-Zeitpunkte bei den Northern-Blot Analysen sind Abb. 27 zu entnehmen.

Nach erhöhter UV-B-Behandlung ($UV-B_{BE}$ 430 mW m^{-2}) wurde das Transkript des Klons UV-R 2/28-1 (E 4) im zeitlichen Verlauf ebenso transient induziert. Das Induktionsoptimum war zum Erntezeitpunkt 7 mit einer 2,9-fachen Induktion zu erkennen (s. Abb. 25).

Das Transkript des Klons UV-R 12/28-1 hingegen blieb durch die erhöhte UV-B-Behandlung nahezu unbeeinflusst (s. Abb. 25).

3.3.2. Klone in Abhängigkeit von Starklicht-Behandlung

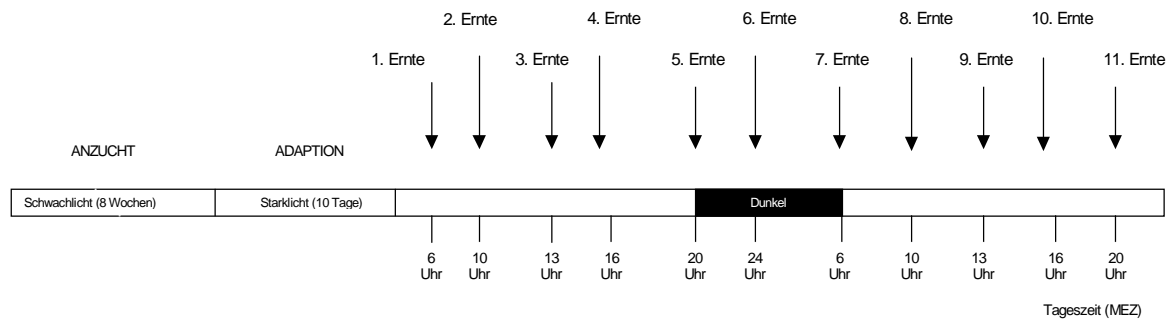


Abb. 26: Erntezeitpunkte der Starklicht-Kontroll-Pflanzen mit den verschiedenen Lichtbedingungen während der Experimente E 3 und E 4. Die Ernte der Primärblätter erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten.

Die Exposition der Pflanzen erfolgte täglich 14 h unter Starklicht (Ernte 1-5). Die Starklicht-Behandlung unterteilte sich in 2 Lichtstufen: 1. Stufe 6 - 20 Uhr (MEZ, PAR 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 2. Stufe 9 - 17 Uhr (MEZ, PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gefolgt von einer 10-stündigen Dunkelperiode (Ernte 5-7; s. Abb. 26 und Anhang Tab. 45).

Die Abb. 27 verdeutlicht bereits zum Erntezeitpunkt 3 unter Starklicht-Exposition die transiente Induktion des Transkriptes des Klons UV-I 1/28-1; bei der Ernte 7 hingegen nahm es ab und pendelte sich im weiteren zeitlichen Verlauf bis zur Ernte 9 wieder auf den Ausgangswert ein.

Der anfänglichen Induktion des Transkriptes von Klon UV-I 1/28-2 folgte ab dem Erntezeitpunkt 8 eine nahezu vollständige Reprimierung (E 4, s. Abb. 27).

Unter Starklicht-Exposition fand eine transiente Induktion des Transkriptes von Klon UV-I 12/28-4 statt (s. Abb. 27). Die maximale Induktion des Transkriptes des Klons zeichnete sich zum Zeitpunkt 7 in E 4 ab.

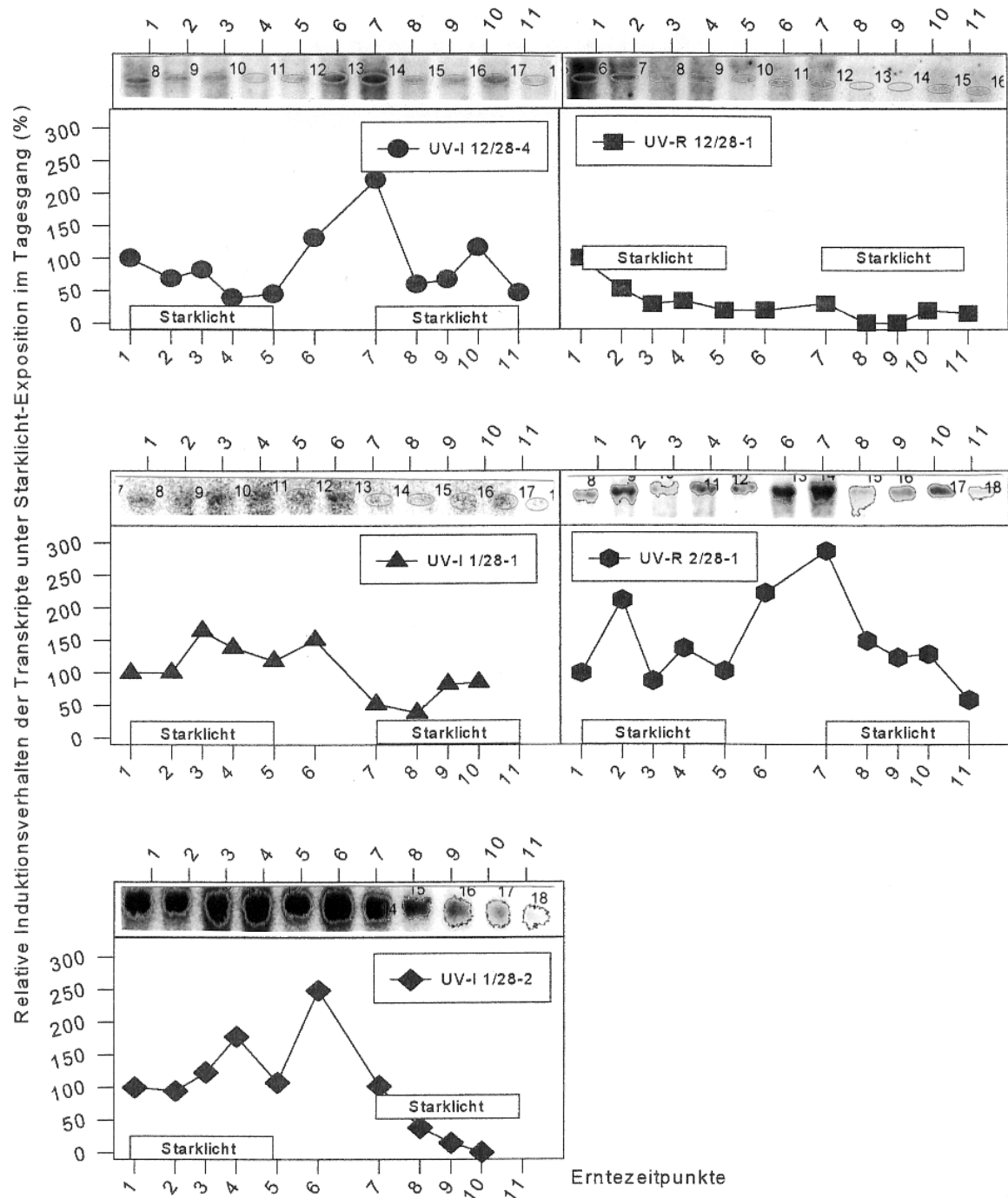


Abb. 27: Kinetiken der mRNA im zeitlichen Verlauf unter Starklicht-Exposition von 5 verschiedenen Buchen-Klonen ausgedrückt in relativen Hybridisierungssignalen aus E 4. Die RNA wurde aus Mischproben bestehend aus 6 Pflanzen isoliert und für die Northern-Blot Analyse eingesetzt.

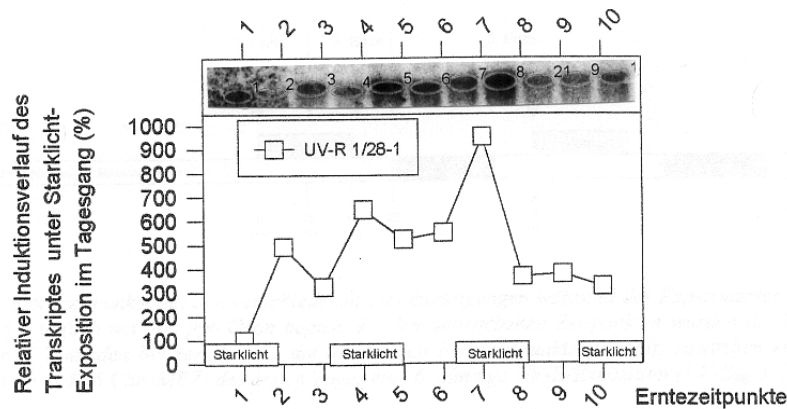


Abb. 28: Unter Starklicht-Behandlung induzierte Transkriptkinetik des Gens *UV-R 1/28-1* ausgedrückt in relativen Hybridisierungssignalen aus E 9 (s. Ernteschema S. 70). Die isolierte RNA setzte sich aus Mischproben zusammen (E 9 n= 10-12) und wurde für die Northern-Blot Analyse eingesetzt.

Eine induzierte Transkriptionsrate im zeitlichen Verlauf unter Starklicht-Exposition zeigte der Klon UV-R 1/28-1: zur Ernte 2 war bezogen auf die anfängliche Transkriptmenge bereits eine 4,9-fache und zum Erntezeitpunkt 7 eine 9,5-fache Induktion des Transkriptes zu erkennen (s. Abb. 28). Danach nahm das Transkript zwar um den Faktor 6 ab, lieferte aber im Vergleich zur anfänglich vorhandenen Transkriptmenge immer noch eine 3-fache Induktion (Ernte 10).

Die mRNA des Klons UV-R 2/28-1 wurde unter Starklicht-Exposition während der Zeitkinetik transient induziert: zum Erntezeitpunkt 2 und 7 in E 4 (s. Abb. 27).

Abb. 27 zeigt, daß die anfänglich vorhandene Transkriptionsrate des Klons UV-R 12/28-1 in E 4 infolge der Starklicht Behandlung nahezu unverändert blieb.

3.3.3. Durch erhöhte Ozon-Konzentration (300 ppb) induzierte Klone

Die Pflanzen wurden unter Starklicht-Bedingungen ($\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) täglich 8 h mit 300 ppb Ozon begast und unterlagen im weiteren zeitlichen Verlauf einem Tag-Nacht-Rhythmus.

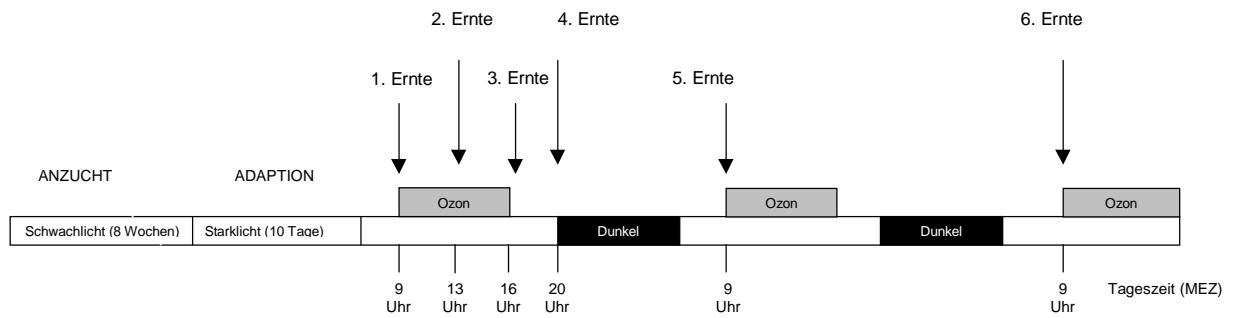


Abb. 29: Erntezeitpunkte mit den verschiedenen Lichtbedingungen während des Experimentes E 5, die Pflanzen wurden 8 h täglich mit 300 ppb Ozon begast. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Primärblätter geerntet. In E 7 wurden bis zur Ernte 5 die identischen Erntezeitpunkte gewählt; zusätzlich erfolgte wahlweise zwischen 10 und 16 Uhr (MEZ) des ersten Tages eine 6-stündige UV-B-Exposition ($UV-B_{BE} 390 \text{ mW m}^{-2}$).

Beispielhaft dafür wurden 2 verschiedene Klone (UV-I 1/28-2 und UV-R 2/28-1) nach erhöhter Ozon-Exposition anhand der Northern-Blot Analyse untersucht (s. Anhang Tab. 46).

Auf den jungen Blättern der Buchen (E 5) waren nach einer 16-stündigen Ozon-Begasung im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen phänotypisch braune, punktförmige Flecken zu erkennen (s. Abb. 30 und Abb. 31). Bei den Blättern der 1. Blatttage zeichneten sich visuell zwischen Kontroll- und Ozon-behandelten Pflanzen keine Unterschiede ab; dies läßt vermuten, daß sich diese Blätter aufgrund ihres Alters (sind ausdifferenziert) gegen Schadstoffe, wie Ozon, besser schützen können. Als Untersuchungsmaterial dienten die phänotypisch ungeschädigten Primärblätter.



Abb. 30: Buchenpflanzen nach einer 16-stündigen Ozon-Begasung (300 ppb Ozon, 8 h täglich). An den jungen Trieben sind nach Ozon-Behandlung (links) deutlich nekrotische Blattzellen zu erkennen. Rechts sind die Kontrollpflanzen abgebildet.



Abb. 31: Buchenpflanzen nach einer 16-stündigen Ozon-Begasung (300 ppb Ozon, 8 h täglich). Nach einer ETOH-Entfärbung der Ozon-behandelten Blätter waren zum Erntezeitpunkt 6 (E 5) bei den jungen Trieben unter Ozon-Behandlung deutlich nekrotische Blattzellen zu erkennen (0,6-fache Vergrößerung). Links: Ozon-behandeltes Blatt; rechts: Kontroll-Blatt.

In Abb. 32 ist die Induktion des Transkriptes des Klons UV-I 1/28-2 während der Ozon-Behandlung dargestellt: die Translationsrate dieses Gens wurde im Verlauf der Kinetik zum Erntezeitpunkt 3, d.h. nach 8 h Ozon-Begasung, 3,3-fach induziert und zum Erntezeitpunkt 6 5,3-fach (entspricht einer insgesamt 16-stündigen erhöhten Ozon-Begasung).

Das Transkript des Klons UV-R 2/28-1 hingegen zeigte während der Ozon-Begasung keine Veränderung (s. Abb. 32).

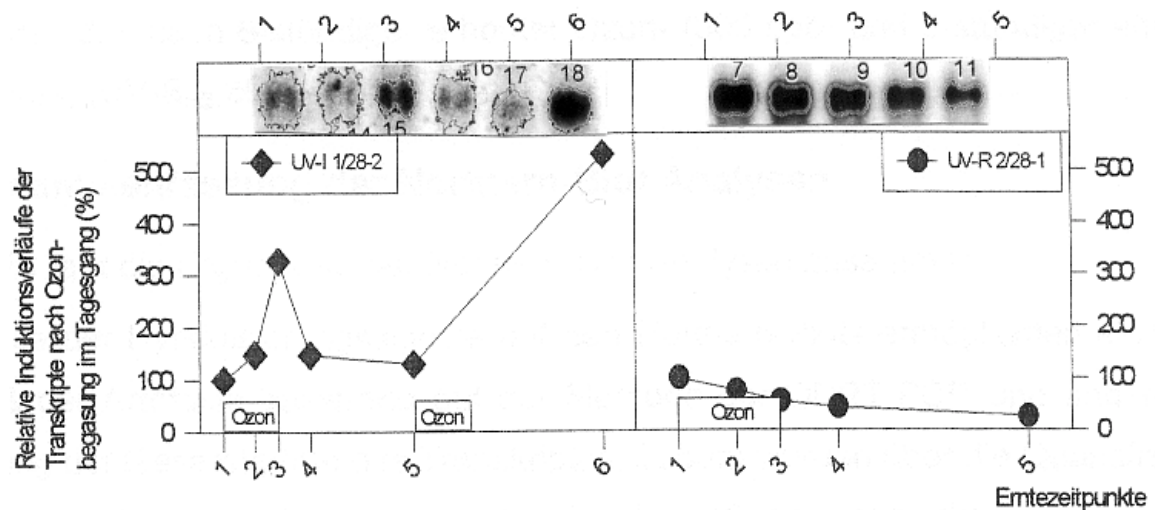


Abb. 32: Relative Hybridisierungssignale 2 verschiedener Buchen-Klone UV-I 1/28-2, und UV-R 2/28-1 unter Ozon-Begasung (300 ppb 8 h täglich) im zeitlichen Verlauf. Die isolierte RNA für die Northern-Blot Analysen setzte sich aus Mischproben (E 5 n=10 (Ausnahme Ernte 6: n=4), E 7 n=8) zusammen. Die Durchführung aller Experimente fand im Prototyp des Sonnensimulators der GSF statt. Die Pflanzen wurden täglich 8 h mit 300 ppb Ozon begast (s. Ernteschema S. 75); anschließend erfolgte die Weiterkultivierung der Pflanzen unter Reinluft. Der Klon UV-I 1/28-2 wurde mit den Northern-Blot Analysen aus E 5 und der Klon UV-R 2/28-1 mit den Northern-Blots aus E 7 hybridisiert.

3.3.4. Klone in Abhängigkeit von erhöhter UV-B/Ozon-Behandlung

Die Pflanzen wurden täglich 6 h erhöhter UV-B-Strahlung ausgesetzt und täglich 8 h mit 300 ppb Ozon begast. Im weiteren zeitlichen Verlauf erfolgte die Weiterkultivierung der Pflanzen unter Starklicht ohne UV-B ($\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und unter einem Tag-Nacht-Rhythmus.

Die Untersuchung des Klons UV-R 2/28-1 fand anhand der Northern-Blot Analyse beispielhaft für die kombinierte UV-B/Ozon-Behandlung statt (s. Anhang Tab. 47).

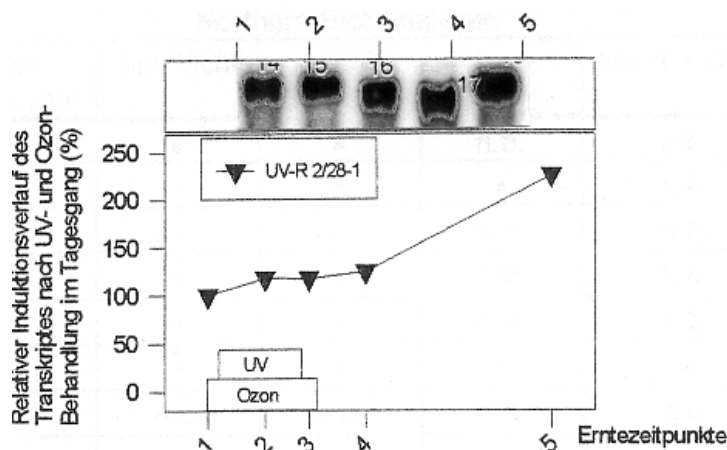


Abb. 33: Relative Hybridisierungssignale des Buchen-Klones UV-R 2/28-1 unter kombinierter UV-B-Exposition und erhöhtem Ozon (300 ppb 8 h täglich) im zeitlichen Verlauf. Die extrahierte RNA für die Northern-Blot Analyse stammte aus Mischproben (E 7 n=8). Das Experiment wurde im Prototyp des Sonnensimulators der GSF durchgeführt. Die Behandlung der Pflanzen umfaßte täglich eine 8-stündige Ozon-Begasung (300 ppb) und zugleich täglich eine 6-stündige erhöhte UV-B-Bestrahlung ($\text{UV-B}_{\text{BE}} 390 \text{ mW m}^{-2}$) (s. Ernteschema S. 75).

Zum Erntezeitpunkt 5 wurde das Transkript des Klons UV-R 2/28-1 um Faktor 2,3 induziert (s. Abb. 33) - d.h. nach 8-stündiger erhöhter Ozon- (300 ppb) und 6-stündiger erhöhter UV-B-Behandlung (UV-B_{BE} 390 mW m⁻² in E 7).

3.3.5. Zusammenfassung der Northern-Blot Analysen

Die Tab. 26 faßt die Ergebnisse der Northern-Blot Analysen zusammen.

Die Analyse der Hybridisierungssignale auf den Northern-Blots ermöglichten einerseits den Ausschluß der Artefakte basierend auf der Methode der DDRT-PCR und andererseits die Bestimmung der Gesamtgröße des Transkriptes. Zudem wurden über die Quantifizierung der Hybridisierungssignale die Tagesgänge der einzelnen Klone untersucht.

Bei 6 Klonen erfolgte die Bestätigung im Northern-Blot basierend auf Gesamt-RNA; die Klone UV-I 5/29-2 und UV-R 10/28-1 lieferten im Northern-Blot basierend auf Gesamt-RNA keine Ergebnisse.

Anhand der durchgeführten Northern-Blot Analysen ist keine Aussage über die UV-B-vermittelte Reprimierung der Klone UV-R 2/28-1 und UV-R 12/28-1 möglich. Klon UV-R 12/28-1 blieb während der Kinetik unverändert und das Transkript des Klons UV-R 2/28-1 zeigte im zeitlichen Verlauf durch die erhöhte UV-B-Behandlung eine Induktion. Die mittels der DDRT-PCR ermittelten UV-B-induzierten Klone hingegen wurden auch aufgrund der durchgeführten Northern-Blots als induzierte Transkripte im Tagesgang bestätigt.

Tab. 26: Überblick über die Größe der Gene der Buchen-Klone (bp) und die untersuchten Tagesgänge unter verschiedenen abiotischen Parametern im Northern-Blot. Die Klone, die in den Northern-Blot Analysen hybridisierten, wurden mit „“ gekennzeichnet, Transkripte ohne Signal im Northern-Blot wurden mit n.n. (nicht nachweisbar) in die Tabelle und nicht durchgeführte Experimente mit n.b. (nicht bestimmt) aufgenommen.*

Northern-Blot Analysen						
Klon	Größe des Transkriptes (bp)	Starklicht	UV-B	Ozon	UV-B + Ozon	UV-induziert anhand des Northern-Blots
UV-I 1/28-1	850	*	*	n.b.	n.b.	ja
UV-I 1/28-2	589	*	*	*	n.b.	ja
UV-I 5/29-2	n.n.	n.b.	n.n.	n.n.	n.b.	n.n.
UV-I 12/28-4	1100	*	*	n.b.	n.b.	ja
UV-R 1/28-1	1400	*	*	n.b.	n.b.	ja
UV-R 2/28-1	1200	*	*	*	*	nein
UV-R 10/28-1	n.n.	n.b.	n.n.	n.n.	n.b.	n.n.
UV-R 12/28-1	2000	*	*	n.b.	n.b.	nein

3.4. Sequenzanalysen von UV-B-induzierten Buchen-Klonen (=UV-I)

Im Anschluß wird die Sequenz dreier Buchen-Klone dargestellt, die im Differentiellen Display eine Induktion nach UV-B-Exposition zeigten. Die Sequenzen weiterer UV-B-abhängiger Klone, die im Datenbankvergleich keine Homologien zeigten, sind im Anhang abgebildet (s. Punkt 3.4. und 3.5.).

Nach Joshi (1987) wurden am Poly-(A)-Ende Poly-(A)-Sites aufgrund der umliegenden Sequenzen bestimmt und ebenso das mögliche Stop-Codon am Ende des Open Reading Frames (ORF).

3.4.1. Klon UV-I 1/28-1

Der Klon umfaßte 429 bp. Die Abb. 34 zeigt ein vollständiges 3'-Ende und putative Poly-(A)-Sites.

Die Sequenz dieses Klons lieferte im TIGR *Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbankvergleich eine geringe Ähnlichkeit zu ABI-3. Für den Sequenzbereich zwischen 48 und 80 bp wurde eine Ähnlichkeit von 90,9 % und eine Identität von 63,6% zu ABI-3 ermittelt. ABI-3 bezeichnet einen von drei genetisch verschiedenen Abscisinsäure-unempfindlichen Loci – ABI-1, ABI-2 und ABI-3- (Koornneef et al., 1984). Aufgrund der Northern-Blot Analyse handelt es sich um ein Transkript von 850 bp.

Abb. 34: Nukleinsäure-Sequenz (425 bp) des UV-B-induzierten Klons UV-I 1/28-1. Das Stop-Codons am Ende des ORF, mögliche Poly-(A)-Sites (AATAAT, AAAAAA) sowie das Poly (A)⁺-Ende sind kursiv dargestellt und die verwendeten DDRT-PCR-Primer markiert (5'-GGACTGGAGT-3', 5'-TTTTTTTTTTTCA-3').

3.4.2. Klon UV-I 1/28-2

Die Sequenz des Klons umfaßt einschließlich des Poly (A)-Endes 378 bp.

Die Sequenz des Klons UV-I 1/28-2 zeigte im Nukleinsäure-Datenbankvergleich (EMBL) eine sehr große Ähnlichkeit zum ribosomalen Protein L37 (60 S Protein) aus der Tomate (Accession-Number X79074). Dieses Resultat wurde sowohl mit dem Nukleinsäure-Vergleich (Fast-Run) als auch durch den Aminosäure-Vergleich (TFASTA, Framesearch) bestätigt.

Bei der Frame-Suche mit der SWISS-PROT-Datenbank ergab die Sequenz des Klons UV-I 1/28-2 zu dem von Werner et al. (1995) publizierten Tomaten-Klon (*Lycopersicon esculentum* L.) eine Ähnlichkeit von 87,5 % und eine Identität von 81,25%. Der Buchen-Klon lieferte 75% Ähnlichkeit zu *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus* und 70% Ähnlichkeit zu *Caenorhabditis elegans* (möglicherweise 60 S).

Die Hybridisierung im Northern-Blot ergab eine Transkriptionsgröße von ca. 590 bp. Die vorliegende Sequenz des ribosomalen Proteins wurde erstmals in der Buche beschrieben (s. Abb. 35).

```

GACTGGAGTGTGAAGGCGATCCGAAGAAAGACTACCGGAACCGGAAGGATGAGGTACAT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
   D W S V K A I R R K T T G T G R M R Y M -

GCGCAACGTGCCTCGCAGATTCAAGAGTGGCTTCAGAGAGGGTACTCAAGCTGCACCAAG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
   R N V P R R F K S G F R E G T Q A A P R -

GAAGAAGGGAGCAGCTGCTACTGCTTAAGGCATCATTGGAGAGTGGTTTTTGATGATGTA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
   K K G A A A T A * G I I G E W F L M M * -

ATTTGGATACCAAATTGCAGTTTTTAGATTGAGTTTATTGTGTGGAACTGGTTTTATAA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
   F G Y Q I A V F R L S L L C W N W F Y K -

AGGCACTGTTTGATGGGTGTTATAACCTTACAATTTAGTTATTTTGGATTGGTTCAGTA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
   G T V * W V L * P Y N L V I F D L V Q Y -

TGTAGTTGCTTTCATTTTGGACAAGGAATATTTCAAATGAATTCTGAATTTGTTTCTG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
   V V A F I L D K E Y F K M N S E F C F W -

GTGAAAAAAAAAAAA
361 -----+----- 378
   * K K K K -

```

Abb. 35: Nukleinsäure-Sequenz (377 bp) des UV-B-induzierten Klons UV-I 1/28-2. Das Stop-Codon am Ende des ORF, mögliche Poly-A-Sites (TATAAA, AAATGA), die Prototyp-Sequenz TATGT – typisch für untersuchte Hefe-Gene - sowie das Poly (A)⁺-Ende sind kursiv dargestellt und die verwendeten DDRT-PCR-Primer markiert (5'-GGACTGGAGT-3'; 5'-TTTTTTTTTTTCA-3').

3.4.3. Klon UV-I 5/29-2

Die Sequenz dieses Klons (s. Abb. 36) zeigte im TIGR *Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbankvergleich eine geringe Ähnlichkeit zu einem Phytochrom regulierten Gen. Für den Sequenzbereich zwischen 160 und 205 bp ergab sich eine 50%-ige Identität und eine 81,2%-ige Ähnlichkeit. Die Größe des Gens konnte nicht ermittelt werden, da die Northern-Blot Analyse negativ war.

```

1  GAGCTTGAAC AGTATTACTA ACGATTTGGA GCATGTGCTC ATGGTAGCCT
51  TTTTGGTTTT GTCATGGAGA TAAAATTTCT TCTCTACCTT CTTAGTGTTT
101 CTGGCTGGGC CCAAGAATTA AATTGTCATA AGACAGATTA ACAGGAGAAA
151 AATACAAATT TTATTTATTT ATTTATTTT TTTTTTTGAG ACAGAGTTTC
201 GCTCTTGTTG CCCAGGCTGG AGTGCAATGG CAGGATCGTG GCTCACTGCA
251 GCCTCTGCTT CCTGGGTCA AGCTCA

```

Abb. 36: Dargestellt ist die Nukleinsäure-Sequenz (267 bp) des UV-B-induzierten Klons UV-I 5/29-2.

3.5. Sequenzanalysen von UV-B-reprimierten Klonen (= UV-R)

Die Sequenzen von 5 Buchen-Klonen, die im Differentiellen Display eine UV-B-Reprimierung zeigten, werden nachfolgend aufgezeigt. Die Sequenzen weiterer UV-B-reprimierter Klone befinden sich im Anhang.

3.5.1 Klon UV-R 1/28-1

Die ermittelte Sequenz dieses Klons umfaßte eine Größe von 322 bp. Am Poly-(A)-Ende wurden nach Joshi (1987) Poly-(A)-Sites bestimmt und ebenso das mögliche Stop-Codon am Ende des ORF (s. Abb. 37).

Zu bereits bekannten Enzymen ergab die EMBL-Datenbanksuche keine Homologien. Die durchgeführte Northern-Blot Analyse bestätigte, daß das Transkript des Klons UV-R 1/28-1 eine Größe von 1,4 kb umfaßt.

```

      GGACTGGAGTCAACGGTTGGCTGGGATCAAAGAAGGCTTGTTAATTATCACATCGAGATT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
a  G L E S T V G W D Q R R L V N Y H I E I -
b  D W S Q R L A G I K E G L L I I T S R F -
c  T G V N G W L G S K K A C * L S H R D F -

      TCTGTGAGTTTCGCAATACGTTAGTTAATTTCTATACTATAATCAATCATATGTTATTTTT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
a  S V S F A I R * * F L Y Y N Q S Y V I F -
b  L * V S Q Y V S N F Y T I I N H M L F L -
c  C E F R N T L V I S I L * S I I C Y F * -

      GAGTGGGAAAGGACTTCCAATTTTAGGAGCACTTCGTCGCTGGTAGCGTTTTTTTAATTG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
a  E W E R T S N F R S T S S L V A F F * L -
b  S G K G L P I L G A L R R W * R F F N C -
c  V G K D F Q F * E H F V A G S V F L I V -

      TTCCATGGGCCACAATCGTGGTTTGGATTATTAGCCTGTCCTAAGATGGATCAAACCACC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
a  F H G P Q S W F G L L A C P K M D Q T T -
b  S M G H N R G L D Y * P V L R W I K P P -
c  P W A T I V V W I I S L S * D G S N H H -

      ATAGCTGTTAAGTGGACCAAGCCAGCTTTTTGGCTGGTATAAACTGAACACAGTTAATGC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
a  I A V K W T K P A F W L V * T E H S * C -
b  * L L S G P S Q L F G W Y K L N T V N A -
c  S C * V D Q A S F L A G I N * T Q L M L -

      TTTATGTGAAAAAAAAAAAAA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 322
a  F M * K K K K -
b  L C E K K K K -
c  Y V K K K K -

```

Abb. 37: Die Nukleinsäure-Sequenz (322 bp) des Starklicht-induzierten Klons UV-R 1/28-1. Das Stop-Codons am Ende des ORF, mögliche Poly-(A)-Sites (AATCAA, TATAAA) sowie das Poly (A)⁺-Ende sind kursiv dargestellt und die verwendeten DDRT-PCR-Primer (5'-GGACTGGAGT-3', 5'- TTTTTTTTTTCA-3') gekennzeichnet.

GGACTGGAGTGGCATCATACAAAAGATATGGGAGACCTGTTTCAACGTGTGCATATACATG

1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60

a G L E W H H T K D M E T C F N V C I Y C -

b D W S G I I Q K I W R P V S T C A Y T A -

c T G V A S Y K R Y G D L F Q R V H I L P -

CATGAGAATCTGGCCAAAGTGAGAGTCAGTGGAAAAGAACAGGCAATATCTACAAGAAAGA

61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120

a H E N L A K V R V S G K N R Q Y L Q E R -

b M R I W P K * E S V E R T G N I Y K K E -

c * E S G Q S E S Q W K E Q A I S T R K N -

ATCCCCAAGTATTGTTTCATCAGCTGGATTAAGAAATTTAAAACTGTCAGAAATTACTCCAA

121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180

a I P K Y C S S A G * E I * N C Q K L L Q -

b S P S I V H Q L D K K F K T V R N Y S K -

c P Q V L F I S W I R N L K L S E I T P R -

GGTTTGGAGAAAAGGATATTGtAACAGAGGAAGTGCGATTACAATTTCAACAGGCAGGGT

181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240

a G L E K R I L * Q R K C D Y N F N R Q G -

b V W R K G Y C N R G S A I T I S T G R V -

c F G E K D I V T E E V R L Q F Q Q A G F -

TTTTGCCTGATTGTTTACTGTTGCTTTTCAGAGCCCAGAATATGTCATCATAAGTCCTC

241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300

a F C L I C L L L L F R A Q N M S S * V L -

b F A * F V Y C C F S E P R I C H H K S S -

c L P D L F T V A F Q S P E Y V I I S P H -

ATTGAATGAATAATAACCGAAGCTGTCACTTATTAGATTAAACACCCCAATTAACTCACA

301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360

a I E * I N N R S C H L L D * H P N * L T -

b L N E * I T E A V T Y * I N T P I N S H -

c * M N K * P K L S L I R L T P Q L T H T -

CAACCACAAACAAATGTAAGAAAGATTAATATTGTAATGTTTCGTGCCATTAAAATTTAG

361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420

a Q P Q T N V R K I N I V M F R A I K I * -

b N H K Q M * E R L I L * C F V P L K F S -

c T T N K C K K D * Y C N V S C H * N L V -

TTGGGTTTCATGGGAAGCTGGAGAACATCACGAACAGGGCACTGCTCACTTGGGTGTGCT

421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480

a L G F M G T G E H H E P G H C S L G C A -

b W V S W E L E N I T N Q G T A H L G V L -

c G F H G N W R T S R T R A L L T W V C L -

TGTACACTAAATTTTCTATCTCTCTCTCTCCCCGCAAGGTGTCTTAACCTGTTTTTAT

481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540

a C T L N F L S L S L S P Q G V L T C F Y -

b V H * I F Y L S L S P R K V S * P V F I -

c Y T K F S I S L S L P A R C L N L F L * -

AGGCACGTCTACTCCAGTCCAATCACT

541 -----+-----+-----+-----+-----+ 567

a R H V Y S S P I T -

b G T S T P V Q S -

c A R L L Q S N H -

Abb. 39: Die Nukleinsäure-Sequenz (567 bp) des UV-B-reprimierten Klons UV-R 10/28-1. Das Stop-Codons am Ende des ORF und mögliche Poly-(A)-Sites (AATAAA, AATTAA, AACAAA, AAGAAA, ATTTAA) sind kursiv abgebildet und der Forward-DDRT-PCR-Primer (5'-GGACTGGAGT-3') markiert.

Der Klon UV-R 10/28-1 war 567 bp lang. Die Charakterisierungen des Klons sind der Abb. 39 zu entnehmen.

Der Vergleich in der TIGR *Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbank ergab eine geringe Ähnlichkeit zur Peroxidase. Für die Aminosäuren (AS) 25 bis 47 wurde eine Identität von 39,1% und eine Ähnlichkeit von 52,2 % ermittelt.

Die Northern-Blot Analyse dieses Klons verlief jedoch negativ, vermutlich lagen die Kopien dieses Transkriptes in zu geringer Anzahl vor. Aufgrund des begrenzten Probenmaterials konnte keine weitere Northern-Blot Quantifizierung - in diesem Fall mit geblotteten mRNA-Transkripten - durchgeführt werden.

3.5.4. Klon UV-R 10/28-3

Für die Sequenz dieses Klons (s. Abb. 40) wurde in der TIGR *Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbank eine geringe Ähnlichkeit zu „DNA directed RNA-Polymerase alpha chain“ von 60% zwischen den Positionen 193 bis 243 bp ermittelt; die Identität in diesem Bereich lag bei 52,9%.

```

1  GGA CTGGAGT TGGATTAAGT GAAATGCACT TATGATATGG CTGCATTGTA
51  ATATACTTTA TAAAGTATGC AGAGAAAAGC TTTAGGTCTC TGGAATATTC
101 ACAAATATAA ATGAACAGTG TTACCCTACA GTAGTCTGTA GGTATCTATC
151 CTCTAAGTAT TAGAAGATCT AGCAAAATTT AAGGAGAAAT TGAAAATAAT
201 TAAGACAACA GGAAAAA AAA TAGATAAACT CATTTTAAAA AAGTAGTATT
251 GAGGCTGGGT GCAGTGGCTC ACCCTGTAA CCCTAGCACT TTGGGAGGCC
301 AAGGCAGAGA TCACTTGAGG CCAGGAGTTC AGACTAGCCT GGCAACATAG
351 ACCCTATCTC TTACAAAAA TTAGCCAGTC ATGGTGGCAT ACGCCTGCAG
401 TCCTAGCTAC CCAGGAGGCT GAGGTTGGGG GATCACTGAG CCTGGGAAGT
451 TGAGGCTGCA GTGAGCCACT A

```

Abb. 40: Die Nukleinsäure-Sequenz (461 bp) des UV-B-reprimierten Klons UV-R 10/28-3.

3.5.5. Klon UV-R 12/29-1

Die Sequenz dieses Klons (s. Abb. 41) lieferte bei einem Vergleich in der TIGR *Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbank eine geringe Ähnlichkeit zu „ara-3, ras-related GTP-binding protein“: der Nukleinsäure-Bereich von 85 bis 111 bp wies eine Identität von 66,7 % und eine Ähnlichkeit von 100% auf.

```

1  GAGCTTGAAC CTGAGAGGCA GAGGTTGCAG TGAGCTGAGA TTGCACTGCT
51  GCACTCCAGC CTGGGCGACA GAGCGAGACT CTGTCAAAAA AAAAAAAAAA
101 AATTCTTGCA AATATACTCA ATAAGATGAG GCTACTGAGT GGCTGGTTAG
151 GCTCACTCAC CAGCTATGCT ATCCATTCCT GCTTGCCAGC CTCAAAGAAT
201 ATGATTAAAA GTTTTATATA GAGGCATGAC TTATCAATC CAAACTTGGT
251 TTGCGACAAA CATCACATTA TGTCAC TGTC TACTGTC ATTAAATGAA AGAGAATCTG
301 CCTCTGAGCT CCCATTCTGC CAGACTATTG GGAAAGTTAA TGTTTGCCCTC
351 AATTGGAAAA TCCCTCCTTC CCTCTAGGGT GGCACAAGAA TCTGGAAGGC
401 TCCTGTGGTT CCTAGAAAAC AGAGGAAGGG GAAGGGACTC TGGTTATGGT
451 CACTGTTCAA GCT

```

Abb. 41: Dargestellt ist die Nukleinsäure-Sequenz (463 bp) des UV-B-reprimierten Klons UV-R 12/29-1.

3.6. Zusammenfassung der identifizierten DDRT-PCR-Buchen-Klone

In Tab. 27 sind die isolierten differentiellen Transkripte mit ihrer Größe, dem poly (A)⁺-Ende, den möglichen Poly-(A)-Sites, den putativen Stop-Codons, die vermutlich das Ende des ORF anzeigen, sowie der Sequenz-Motive im Überblick dargestellt. Die cDNA-Längen der isolierten Klone liegen zwischen 285 bp und 620 bp.

Die Sequenzen, die hier nicht aufgeführt wurden, befinden sich im Anhang. Diese Sequenzen lieferten bis zum heutigen Stand in den Datenbankvergleichen keine Homologien.

Bei einzelnen Klonen wurde die RACE-Technologie eingesetzt, um das 3'- und 5'-Ende zu amplifizieren. Bei beiden Vorgehensweisen erfolgte zwar eine Amplifizierung, aber die anschließende Sequenzierung zeigte, daß lediglich ribosomale RNA-Banden amplifiziert wurden.

Tab. 27: Überblick über die Größe der differentiellen Transkripte (Basenpaare = bp), das Vorhandensein des poly (A)⁺-Endes, der Poly-(A)-Sites, der Stop-Codons am möglichen Ende des ORF und über deren Motive beim EMBL-Datenbankvergleich sowie in der TIGR Arabidopsis thaliana-EST-Datenbank.

Klon	Poly-A-Ende	Poly-A-Site	Stop-Codon	Ähnlichkeit	cDNA-Länge
UV-I 1/28-1	+	+	+	geringe Ähnlichkeit zu „ABI-3“	429
UV-I 1/28-2	+	+	+	hohe Identität zu „RIBOSOMAL PROTEIN L37“	377
UV-I 5/28-1		+	+		620
UV-I 5/28-3					600
UV-I 5/29-1					285
UV-I 5/29-2		+		geringe Ähnlichkeit zu „phytochrome regulated gene“	276
UV-I 10/28-2				geringe Ähnlichkeit zu „squalen synthase“	550
UV-I 10/28-3					391
UV-I 10/28-4		+	+	Microbodies C-terminal targeting signal AHA	510
UV-I 12/28-2					500
UV-I 12/28-4					286
UV-R 1/28-1	+	+		Glycosaminoglycan attachment site SGK Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site GPQSchwachlichtFGLAC	323
UV-R 2/28-1	+	+		hohe Identität zu „NASCENT POLYPEPTIDE ASSOCIATED COMPLEX ALPHA CHAIN“	419
UV-R 10/28-1		+	+	geringe Ähnlichkeit zu „Peroxidase“	573
UV-R 10/28-2					474
UV-R 10/28-3		+	+	geringe Ähnlichkeit zu „DNA directed RNA-Polymerase alpha chain“	489
UV-R 12/28-1		+	+	Amidation Site SGRK Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site VLF*LSFIFSC	430
UV-R 12/28-2					369
UV-R 12/29-1		+	+	geringe Ähnlichkeit zu „ara-3, ras-related GTP-binding protein“	466

IV. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, frühe Effekte nach erhöhter UV-B-Exposition bei der Rotbuche *Fagus sylvatica* L. zu erfassen. Die Effekte sollten auf löslicher Gesamtprotein- und Transkriptionsebene analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal Untersuchungen an der Buche auf Genebene nach erhöhter UV-B-Behandlung durchgeführt.

Eingesetzt für die Untersuchungen wurden die Buchen aus dem Herkunftsgebiet 81014 Landsberg, Staatliche Samenklänge Laufen, aus dem Reifejahr 1992. Die Rotbuche gilt als weit verbreitet, sie kommt sowohl in Tiefebene als auch in Höhenlagen über 900 m vor. Zur Gewährleistung einer hohen Reproduzierbarkeit der Experimente wurde die Anzucht der Sämlinge anfangs optimiert. Die Exposition der Pflanzen erfolgte mit dem Zeitpunkt der Keimung unter einem UV-B/PAR-Verhältnis, das den natürlichen Umweltbedingungen sehr ähnlich ist (Thiel et al., 1996). Zahlreichen Experimenten in Expositionskammern liegen zwar UV-B-Intensitäten zugrunde, die mit den natürlichen vergleichbar waren, aber die korrespondierenden hohen PAR-Anteile fehlten (Strid et al., 1990; Strid & Porra, 1992). Anhand von Untersuchungen an Getreidepflanzen wurde gezeigt, daß niedrige PAR-Intensitäten die Empfindlichkeit gesteigert haben (Teramura, 1980a, 1980b; Cen & Bornman 1990).

Als Untersuchungsmaterial dienten die bereits ausdifferenzierten Primärblätter. Die Buchensämlinge wurden als Modellsystem zur Untersuchung der umweltrelevanten UV-B-veränderten Genexpression eingesetzt.

Day et al. (1992) teilten die Pflanzen entsprechend ihrer Epidermis-Transmission in unterschiedliche Typen ein: Koniferen > Getreidearten > krautige Dikotyledonen. Koniferen-Nadeln sind gegenüber erhöhter UV-B-Strahlung weniger empfindlich als Getreidearten. Da es jedoch keine Arbeiten gab, auf die bezüglich der UV-B-Sensitivität der Buche zurückgegriffen werden konnte, erfolgten vorweg Untersuchungen auf Gesamtproteinebene. Diese dienten dazu, die Buche bezüglich ihrer UV-B-Antwort einzuordnen und relevante Zeitpunkte zur Untersuchung auf Genebene zu ermitteln. Die UV-B-Exposition erfolgte täglich über 6 h. Zum Erfassen früher Antworten nach UV-B-Exposition wurden die Pflanzen in einer Zeitkinetik geerntet.

Die pflanzlichen Streßantworten werden unter natürlichen Bedingungen von verschiedenen gleichzeitig vorhandenen Streßfaktoren ausgelöst. Die Analyse solcher komplexer Antworten ist jedoch nur möglich, wenn die Streßfaktoren vorweg einzeln untersucht werden. Der Vorteil von Kammerexperimenten liegt in der Standardisierung der Umweltparameter und somit in der Einschränkung auf einen einzelnen Streßfaktor. Diese Experimente sind untereinander vergleichbar und die Veränderungen auf molekularer Ebene können daher eindeutig dem jeweiligen Streßfaktor, z.B. UV-B, zugeordnet werden.

1. Gibt es eine Übereinstimmung der 2D-PAGE Analysen auf mRNA- und Gesamtproteinebene nach erhöhter UV-B-Exposition?

Um diese Frage zu beantworten, wurden die Ergebnisse der *in vitro* translatierten Proteine mit denen auf löslicher Gesamtproteinebene unter UV-B-Exposition bezogen auf die jeweilige Starklicht-Kontrolle im Vergleich betrachtet.

Auf Gesamtproteinebene wurden ebenso wie auf Transkriptionsebene anfangs vermehrt Proteine reprimiert (s. Abb. 42 links oben: *in vitro* translatierte Proteine, links unten: Gesamtprotein). Dieser anfängliche hohe Reduktionswert nahm anschließend ab, stieg ein 2. Mal an und sank erneut ab. Bei Betrachtung der Gesamtproteindaten zeigte sich nach 8 Tagen eine weitere 24%-ige Erhöhung des Anteils der reprimierten Proteine (s. Abb. 42).

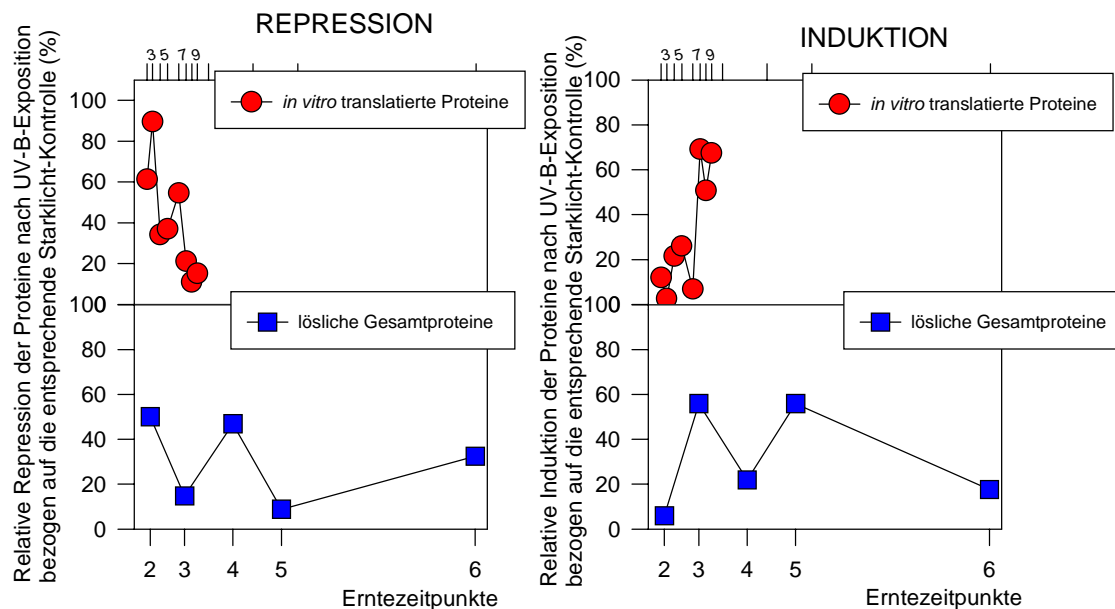


Abb. 42: Repressionsverläufe (links) und Induktionsverläufe (rechts) der *in vitro* translatierten Proteine und löslichen Gesamtproteine unter UV-B-Exposition bezogen auf die jeweilige Starklicht-Kontrolle während der gesamten Zeitkinetik. Die Repressionen und Induktionen beziehen sich auf die prozentualen Anteile der insgesamt quantifizierte Proteine. Die Pflanzen wurden täglich 6 h erhöhter UV-B-Strahlung ausgesetzt. Die Experimente für die Untersuchung wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: *in vitro* translatierte Proteine (PAR $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV- B_{BE} 430 mW m^{-2} bzw. UV- $B_{BE} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$ = Kontrolle) und lösliche Gesamtproteine (PAR $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV- B_{BE} 720 mW m^{-2} bzw. UV- $B_{BE} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$ = Kontrolle).

Abb. 42 belegt die Übereinstimmung der erhaltenen Daten auf löslicher Gesamtproteinebene und Translationsebene: die induzierten Proteine auf Translations- (s. Abb. 42: rechts oben) und Gesamtproteinebene (s. Abb. 42, rechts unten) zeichnen sich durch ähnliche Tendenzen aus. Im Vergleich zu den Gesamtproteindaten waren die auf Translationsebene erzielten Effekte stärker und wesentlich früher zu erkennen.

Mackerness et al. (1997) beschrieben dieselben Effekte: UV-B-Expositionen von Erbsenblättern resultierten in einer dramatischen mRNA-Abnahme der Zellkern-kodierten Gene; *cab*- und *rbcS*-mRNA-Gehalte wurden nach 2 Tagen UV-B-Behandlung reprimiert. Obwohl UV-B zu einer Repression der *cab*-mRNA-Spiegels bei der Erbse führt, war der Effekt auf Proteinebene verzögert und die Proteingehalte nahmen im Vergleich zu den RNA-Gehalten langsamer ab. Diese zeitlich verzögerte Abnahme der Proteine gegenüber den RNA-Leveln ist auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen an Buche deutlich zu sehen (s. Abb. 42: Vergleich *in vitro* translatierte Proteine oben und Gesamtproteine unten). Die verstärkte Abnahme der Transkripte kann entweder durch eine reprimierte Transkriptionsrate oder durch den gesteigerten Abbau der Transkripte erklärt werden. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, daß nach UV-B-Exposition von Buchenblättern eine Regulation auf Transkriptebeune stattfindet.

Kuhlemeier et al. (1987) zeigten, daß die Regulation Zellkern-kodierter Gene der Chloroplasten-Proteine häufig auf Transkriptionsebene erfolgt. Chloroplasten-kodierte Gene hingegen werden primär posttranslational verbunden mit Änderungen der RNA-Gehalte kontrolliert, weshalb diese zeitlich gesehen später nachzuweisen sind (Mackerness et al., 1997). Möglicherweise ist dies eine Erklärung für die Reprimierung der Proteine nach 80 h bei der Buche.

2. Überwiegend vorkommende Induktionsverläufe der Proteine auf Translations- und löslicher Gesamtproteinebene

Um die Induktionsverläufe der einzelnen Proteine aufzuzeigen, wurden die Induktions- und Reduktionsfaktoren ihrer Spots über den gesamten zeitlichen Verlauf hinweg betrachtet. Die Quantifizierung erfolgte bei den *in vitro* translatierten Proteinen mittels des Phosphorimagers, der eine lineare Beziehung zwischen den Schwärzungen und der eingebauten Radioaktivität gewährleistet. Deshalb wurden Induktions- und Repressionsfaktoren $< 1,6$ als unverändert behandelt (liegt in der Streuweite des Hintergrunds) und diese blieben in der Diskussion der Induktionsverläufe unberücksichtigt.

Bei Betrachtung der im Tagesgang untersuchten Proteine (*in vitro* translatierte Proteine und Gesamtproteine) unter Starklicht-Exposition zeigten sich unterschiedliche Induktionsverläufe: über die gesamte Zeitkinetik lagen auf Gesamtproteinebene 60% der Proteine und auf *in vitro* Translationsebene nur 10% konstant reprimiert vor. Hingegen gab es auf Translationsebene um den Faktor 2 mehr induzierte und variable Proteinspots und sogar um den Faktor 4 erhöhte transient induzierte Spots (s. Tab. 28).

Bei den UV-B-exponierten Proteinen im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle zeigte sich auf Translationsebene im Vergleich zur Gesamtproteinebene ein um den Faktor 1,6 erhöhter variabler Proteinanteil. Der Anteil der reprimierten Proteine liegt sowohl auf

Transkriptionsebene als auch auf Gesamtproteinebene nahezu vergleichbar. Auf Gesamtproteinebene waren im Vergleich zur Translationsebene 4,2-fach mehr Proteine transient induziert, 2,4-fach mehr Proteine induziert sowie 1,6-fach mehr Proteine transient reprimiert (s. Tab. 28).

Tab. 28: Induktionsverläufe der Proteine auf Translationsebene (oben) und Gesamtproteinebene (unten) über die gesamte Zeitkinetik. Die Experimente für die Untersuchung wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: *in vitro* translatierte Proteine (PAR $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV- B_{BE} 430 mW m^{-2} bzw. UV- $B_{BE} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$ = Kontrolle) und lösliche Gesamtproteine (PAR $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV- B_{BE} 720 mW m^{-2} bzw. UV- $B_{BE} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$ = Kontrolle).

	Lösliche Gesamtproteine (%)		In vitro translatierte Proteine (%)	
	unter UV-B-Exposition bezogen auf die jeweilige Kontrolle	unter Starklicht- Exposition im Tagesgang	unter UV-B-Exposition bezogen auf die jeweilige Kontrolle	unter Starklicht- Exposition im Tagesgang
Reprimiert	17,1	60	20,5	10,5
Transient reprimiert	11,4	5,7	7,2	2,3
Induziert	11,4	8,6	4,8	16,3
Transient induziert	20,0	5,7	4,8	24,4
Variabel	40,1	20	62,6	46,5

Diese abwechselnde Repression und Induktion auf Genebene deutet darauf hin, daß die Pflanze zuerst den Metabolismus stoppt und vermutlich diese Umsteuerung des Stoffwechsels aufgrund der anschließenden Induktion der Proteine reversibel ist. Es gibt einige Arbeiten, die transiente Repressionen bei verschiedenen Pflanzen nach UV-B-Streßbehandlung beschreiben: nach 4 h UV-B war die transiente Abnahme des Transkriptes des cab-Gens zu sehen (Jordan, 1993; Jordan et al., 1991). Logemann et al. (1995) betrachten das kurzzeitige Einstellen des Zellkulturwachstums als vorübergehend, damit die Zelle in hohem Ausmaß die Gene auf Transkriptionsebene aktivieren kann, die zum UV-B-Schutz notwendig sind. Die vorübergehende drastische Abnahme der mRNA nach UV-B-Exposition wurde in *Pisum sativum* L. beschrieben (Jordan et al., 1992); nach 3 Tagen konnte die ursprüngliche Rate der mRNA-Transkripte wieder nachgewiesen werden.

In *Arabidopsis* wird die Induktion der Transkripte der photoreaktivierenden Enzyme durch PAR, Blau- oder UV-A-Licht verstärkt, aber nicht durch Rot- oder UV-B-Licht (Ahmad et al., 1997). Die Dimerisierung der Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere wird hauptsächlich durch UV-B ausgelöst (Britt, 1996); die Reparatur erfolgt durch die Photolyase unter Blau- oder UV-A-Licht (Britt, 1996; Sancar 1996). Wird die Dimerisierung nicht behoben, dann führt dies auf der Ebene der RNA-Polymerasen zur Blockade der Transkriptionsaktivität (Britt, 1996). Somit ist die Fähigkeit zur DNA-Reparatur ein wichtiger Aspekt für die Adaptation an UV-B-Strahlung (Jansen et al., 1998).

Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für die anfänglich erhöhte Repression der Gene, die durch die darauffolgende Induktion der Gene abgelöst wird.

3. Starke Reprimierung auf Gen- und Proteinebene nach UV-B-Exposition

Die Untersuchungen auf Gen- und Proteinebene an Buchensämlingen zeigten nach 3 und 6 h UV-B-Exposition eine überwiegende Reprimierung der Transkripte und der Proteine. Eine erste Repression der Transkripte war bereits nach 3-stündiger UV-B-Exposition der Buchenblätter mit 61% zu erkennen; nach insgesamt 6 h UV-B-Exposition erfolgte eine weitere Reprimierung der Transkripte auf insgesamt 90%.

Eine rasche Reprimierung der Expression einiger Gene nach Exposition eines Stressors wurde in der Literatur bereits nach Hitzeschock-Behandlung diskutiert (Jordan, 1996), z.B. die Repression des H6-Transkriptes – einem Calcium-bindenden Protein involviert in die Regulation des Zellzyklus (Zhu et al., 1996). Diese auf einen Hitzeschock folgenden Reaktionen zählen zu den reversiblen Ereignissen in der Zelle (Zhu et al., 1996), die kurzfristig eine tiefgreifende Änderung des Zellstoffwechsels, der Ultrastruktur und der Genexpression bewirken (Vierling, 1991; Neumann et al., 1989; Howarth, 1991; Lindquist & Craig, 1988). Die Regulation kleiner Hitzeschockproteine in Pflanzen erfolgt auf Transkriptionsebene durch Erhöhung der Temperatur (Gurley & Key, 1991) und diese Induktion der Hitzeschockproteine ist transient (Vierling, 1991). In tierischen Systemen und in Hefe wurde von einer Hemmung des Intron-Splicings nach extremen Hitzeschock berichtet (Yost & Lindquist, 1986); in Pflanzen hingegen wurde die Störung des Intron-Splicing-Systems nach Schwermetallstreß beschrieben (Nash & Walbot, 1992).

Der Anteil der reprimierten Proteine nach UV-B-Exposition nimmt 10 h nach Versuchsbeginn wieder ab und scheint direkt mit der UV-B-Expositionsdauer gekoppelt zu sein. Zum Erntezeitpunkt 5 - d.h. nach 6 h erhöhter UV-B-Exposition und anschließend 4 h unter Starklicht weiter kultiviert - waren sich die *in vitro* Translationsmuster von Starklicht mit und ohne UV-B-Behandlung relativ ähnlich. Diese durch UV-B-bedingte Reprimierung ist ebenso wie die nach Hitzeschockbehandlung reversibel. Nedunchezian et al. (1992) fanden nach UV-B-Exposition die Expression von Hitzeschock-ähnlichen Proteinen in *Vigna sinensis* Sämlingen; dies läßt vermuten, daß nach Exposition unter Hitzeschock und UV-B ähnliche Streßantworten hervorgerufen werden.

Ozon hingegen hemmt zum Beispiel nach Guzy & Heath (1993) bei Bohnen die Aktivität der Membran gebundenen ATPasen. Kiiskinen et al. (1997) zeigten aber in Birke eine Ozon-bedingte Induktion (bereits nach 2 h) des mitochondrialen Phosphattranslokators, welcher eine Erhöhung des Energiestoffwechsels bewirkt. Willekens et al. (1994) belegten, daß die Ozon- und UV-B-vermittelten Effekte bezüglich der Transkripte der antioxidativen Gene sehr

ähnlich sind: sowohl nach Ozon als auch nach UV-B wird in Tabakblättern die Expression antioxidativer Gene beeinflusst. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, daß auch nach Exposition mit UV-B eine Repression zahlreicher Proteine wie nach Ozon-Exposition in Weizenblättern (Nie et al., 1993) ausgelöst wird.

Reprimierte Genexpressionen wurden des öfteren an verschiedenen Pflanzen nach UV-B-Behandlung beobachtet. Zu den sehr frühen UV-B-Antworten (4 und 8 h nach UV-B) in *Pisum sativum* zählten die Abnahme der mRNA-Transkripte für zwei an der Photosynthese beteiligte Proteine (Chlorophyll a/b bindendes Protein und D1-Protein, Jordan et al., 1991). Desweiteren beschrieben Jordan et al. (1992), daß die Abnahme der beiden Proteinuntereinheiten von RubisCo mit der Reduktion der entsprechenden RNA-Transkriptlevel für die beiden Untereinheiten korreliert. Vermutlich hat UV-B auf die Biosynthese mehrerer Zellkern-kodierter Chloroplasten-Proteine einen reduzierenden Effekt (Bornman & Teramura, 1993; Strid et al., 1994). Die Transkripte der Zellkern-kodierten cab-Gene nahmen sehr schnell mit der UV-B-Exposition ab (80-%ige Reprimierung innerhalb von 4 h), während die Abnahme der Chloroplasten-kodierten Gene eine stärkere zeitliche Verzögerung gegenüber UV-B zeigten (Strid, 1993).

4. Induktion auf Gen- und Proteinebene nach UV-B-Exposition

Nach 3 und 6 h UV-B-Exposition wurden nur vereinzelte überwiegend saure Proteine mit einem kleinen MG induziert. Die durch das UV-B-Signal vermittelte Umsteuerung des Metabolismus bewirkt eine gesteigerte Synthese einzelner Gene, wie die des Flavonoidstoffwechsels. Strid (1993) beschrieb bei *Pisum sativum* nach UV-B-Exposition eine induzierte Genexpression der Chalkonsynthase und Glutathionreduktase und eine Reduzierung der Superoxiddismutase. In den Primärblättern von Gerste wurde eine verlängerte Phenylalanin-ammonium-lyase-Aktivität durch UV-B gegenüber Kontrollpflanzen beobachtet (Liu and McClure, 1995), die mit einer erhöhten Flavonoid- und Ferulasäureakkumulation korrelierte. Die Repression bzw. Induktion der Expression dieser Gene fungierten als direkte Streßantwort der Pflanze auf die erhöhte UV-B-Behandlung.

4.1. Durch UV-B-Exposition vermittelte Induktion/ Repression von überwiegend sauren in vitro translatierten Proteinen

Die meisten reprimierten Proteine (nach 3 h und 6 h UV-B-Exposition) konnten durch einen sauren pI charakterisiert werden. Nach UV-B-Exposition wurde in Buchenblättern die Induktion der Transkripte von sauren Proteinen mit einem MG < 30 kDa gezeigt. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Daten könnte es sich bei den induzierten Transkripten um saure PR-Proteine und Hitzeschockproteine mit einem MG kleiner 35 kDa handeln. Jedoch müssen noch weitere Experimente durchgeführt werden, um diese Hypothese zu bestätigen.

Zu Proteinen mit einem sauren pI und einem kleinen MG zählen die PR-Proteine. Thalmai et al. (1996) zeigten, daß nach UV-B-Behandlung von Tabakpflanzen verschiedene PR-Proteine, wie β -1,3-Glucanase und die Chitinase, induziert wurden. Ebenso wurde in Maispflanzen nach UV-B-Behandlung die Induktion der Chitinasen und β -1,3-Glucanasen (254 nm) nachgewiesen (Didierjean et al., 1996). Green & Fluhr beschrieben (1995) die UV-B-bedingte Induktion des PR-1 Transkriptes in Tabak.

Die Gruppe der PR-Proteine kann nach van Loon et al. (1994) entsprechend dem pI in saure und basische Proteine unterteilt werden. Überwiegend sind die sauren Formen extrazellulär im Apoplasten lokalisiert und die basischen intrazellulär in der Vakuole (Meins et al., 1992). Wie bereits oben erwähnt, wurden infolge UV-B-Exposition insbesondere Zellkern-kodierte Chloroplasten-Proteine reprimiert (Bornman & Teramura, 1993). Logemann et al. (1995) fanden in UV-B-exponierten Petersilienzellen eine Repression auf Transkriptionsebene einiger Zellzyklus-Gene: der Genfamilie der Histone H2A, H2B, H3 und H4 und der Gene, die die p34cdc2 Proteinkinase und ein mitotisches Cyclin kodieren. Im Vergleich zu Elicitor-behandelten Zellen war die UV-B-bedingte Antwort transients und geringeren Ausmaßes. Das kurzzeitige Einstellen des Zellkulturwachstums ist nötig, damit die Zelle die transkriptionelle Aktivierung der Gene, die zum UV-B-Schutz notwendig sind, verstärken kann (Logemann et al., 1995).

Nozaki et al. (1997) fanden nach UV-B-Exposition von Mauszelllinien drei Isoformen des HSP27 – ein Streßprotein mit geringem MG; zwei davon lagen infolge des UV-B-Stresses phosphoryliert vor. Zudem gibt es Hinweise, daß HSP27 für Zellen eine schützende Wirkung gegenüber Hitzeschock und oxidativem Streß besitzt (Mehlen et al., 1993). Bei UV-B-Bestrahlung des Hautgewebes von Mäusen wurde die Induktion der HSP70-Genexpression in der Epidermis nachgewiesen (Maytin, 1992). Umgekehrt wirkte eine Hitzebehandlung schützend vor einer anschließenden UV-B-Exposition (Trautinger et al., 1995).

4.2. Charakteristische Proteinspots auf löslicher Gesamtprotein- und in vitro Translationsebene nach UV-B-Exposition

Die Pflanzenanzucht erfolgte unter Schwachlicht-Bedingungen und gleichzeitiger UV-B-Exposition im Gegensatz zu Starklicht mit und ohne UV-B. Die Anzucht der Buchensämlingen wurde unter den UV-B/PAR- Bedingungen durchgeführt, die den natürlichen Bedingungen sehr ähnlich sind (Thiel et al., 1996). Deshalb waren die erzielten Effekte geringeren Ausmaßes. Desweiteren zeigten Pflanzen, die unter hohen PAR- Intensitäten kultiviert wurden, verstärkte Resistenz gegenüber UV-B-Schäden (Deckmyn et al., 1994; Cen & Bornman, 1990; Warner & Caldwell, 1983; Mirecki et al., 1984).

Bei der nachfolgenden Betrachtung werden nur Proteine miteinbezogen, deren Induktionsverhalten über die gesamte Zeitkinetik Veränderungen unterlagen. Protein 28 (17

kDa, $pI=6,8$) wurde unter UV-B-Exposition bezogen auf die entsprechende Starklicht-Kontrolle stets induziert.

Auf *in vitro* Translationsebene gibt es 1 Protein mit verändertem Induktionsverhalten nach erhöhter UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle. Das *in vitro* translatierte Protein 9 (14,7 kDa; pI 5,5) lag nach UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle über die gesamte Zeitkinetik *reprimiert-induziert-reprimiert* vor; nach Starklicht-Exposition im Tagesgang wurde es stets reprimiert.

Tab. 29: Zusammenfassung der *in vitro* translatierten Proteinspots, die nach UV-B-Exposition neu gebildet wurden oder gegenüber der Starklicht-Kontrolle fehlten - bezogen auf die entsprechende Starklicht-Kontrolle unter Berücksichtigung der im UV-B-Tagesgang vorhandenen Änderungen.

MG	pI	Spot	Erntezeitpunkte						
			3	4	5	6	7	8	9
13,5	4,2	5	neu			neu			
76,7	4,2	63				neu			
16,6	4,5	4				neu			neu
65,3	4,75	67							neu
59,6	5	73							neu
90,8	5,95	65							neu
23,3	6	15				neu			
59,6	6,55	53							neu
40,9	6,9	37							neu
32	8,3	30							neu
25,8	5,5	17						fehlt	
35,9	5,5	80							fehlt
62,4	6,3	84	fehlt	fehlt					
16	7,9	13						fehlt	
46,8	8,4	33						fehlt	
34,5	9,1	32						fehlt	
51,5	9,1	34						fehlt	
12,9	9,5	78		fehlt		fehlt			

Es gab Transkripte, die nach UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle neu entstanden oder fehlten. Um nur diese Unterschiede zu erfassen, wurden die entsprechenden Daten unter Berücksichtigung der UV-B-bedingten Effekte im Tagesgang in Tab. 29 dargestellt. Es existierten 10 neu vorkommende *in vitro* translatierte Proteine und 8 Proteine, die nach UV-B-Exposition auf Transkriptebene nicht mehr nachweisbar waren. Die neuen Proteine wurden zu 3 verschiedenen Erntezeitpunkten, nämlich zu Ernte 3 (3 h UV-B), Ernte 6 (insgesamt 6 h UV-B) und Ernte 9 (insgesamt 9 h UV-B) detektiert. 7 der 10 neu gebildeten Proteine zeichneten sich durch einen sauren pI aus, 2 durch einen neutralen und 1 durch einen basischen pI . Nach 3 h UV-B wurde das Protein 5, mit einem sauren pI und einem MG von 13,5 kDa, neu gebildet; zum Erntezeitpunkt 6 wurden die Transkripte 4 weiterer Proteine mit einem sauren pI neu nachgewiesen und zum

Erntezeitpunkt 9 die Transkripte 4 saurer Proteine, 2 neutraler Proteine und 1 basischen Proteins. Größtenteil wurden auch hier Proteine mit einem sauren oder basischen pI neu gebildet oder nicht mehr nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, daß es sich auch bei diesen Proteinen um PR-Proteine oder Hitzeschockproteine handeln könnte.

Die Transkripte der 8 Proteine (MG 12,9 – 62,4 kDa), die nach UV-B nicht mehr detektiert wurden, unterteilten sich in 3 saure und 5 basische Proteine. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Kinetik (Ernte 3, 4, 6, 8 und 9, s. Ernteschema S. 50) wurde das Verschwinden dieser Proteine gezeigt.

Auffällig war, daß überwiegend saure und basische Proteine (17 von 18 Proteinen) nach UV-B-Behandlung im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle neu induziert oder nicht mehr nachgewiesen wurden.

5. Die Vor- und Nachteile des Differentiellen Displays

Zur Analyse der differentiell exprimierten Transkripte wurde das Differentielle Display eingesetzt. Die Technik des Differentiellen Displays eignet sich für die Identifizierung und das Klonieren von differentiell exprimierten Genen (Bauer et al., 1993; Liang & Pardee, 1992; Liang et al., 1993; Guimarães et al., 1995). Das Differentielle Display ermöglicht das gleichzeitige Durchsuchen einer großen Anzahl von Transkripten, wobei diese nicht bekannt sein müssen. Diese Methode gilt als Alternative zum subtraktiven Screenen mittels der cDNA-Bank-Technik. Das substraktive Screenen ist im Vergleich zum Differentiellen Display zeitaufwendig, arbeitsintensiv und es werden große Mengen an RNA benötigt. Die Wahrscheinlichkeit cDNAs, die mRNAs mit geringer Kopienanzahl repräsentieren, mittels des Differentiellen Hybridisierens oder des subtraktiven Hybridisierens zu isolieren, ist sehr gering.

Die Methode des Differentiellen Displays weist jedoch auch einige Nachteile auf:

- Niedrige Anlagerungs-Temperatur während der PCR kann zu unspezifischen PCR-Produkten führen.
- Bei der elektrophoretischen Auftrennung der differentiellen PCR-Produkte kann es zur Überlagerung von unterschiedlichen PCR-Produkten gleicher Größe kommen (Mischproben) (Bauer et al., 1993).
- Die dT₁₁-MN-Primer binden nicht nur an das 3'-Ende, sondern auch innerhalb der cDNA (Guimarães et al., 1995).
- Die isolierten cDNA-Fragmente liegen in einem Bereich zwischen 100 und 500 bp (Liang et al., 1993; Chandrashekhar & Nguyen, 1996).
- Die Polyadenylierung für dieselbe mRNA-Sequenz kann in Eukaryoten über verschiedene Polyadenylationsorte erfolgen (Joshi, 1987). Aus diesem Grund kann dieselbe

Sequenz im Differentiellen Display in Abhängigkeit vom benutzten Anchor-Primer in verschiedenen Reaktionen als differentielle Bande erscheinen (Chandrashekhar & Nguyen, 1996).

- Das Muster der differentiellen Expression kann oft nicht durch Northern-Blot reproduziert werden; diese falsch Positiven können über 70% liegen (Sompayrac et al., 1995).
- Die isolierten cDNA-Fragmente umfassen meist 300 bp, welche Teil des 3'-nicht translatierten Bereiches sein können und somit über den Datenbankvergleich häufig nicht zum Erfolg führen (Sompayrac et al., 1995).

Die mittels DDRT-PCR isolierten cDNA-Fragmente werden sequenziert, wodurch poly (A)-Sites sowie Stop-Codons anhand der umliegenden Sequenzen identifiziert werden können (Joshi, 1987; Rothnie et al., 1994). Ausgehend davon werden Datenbankvergleiche durchgeführt. Es gibt einzelne Arbeiten, die nicht alle isolierten DDRT-PCR Klone über die Northern-Blot Analyse verifizieren konnten (Blanchard & Cousins, 1996) oder Klone ohne Poly (A)-Signal isoliert haben (Joshi & Nguyen, 1996). Da die Methode für ihre Neigung zu Artefakten bekannt ist, muß eine Bestätigung der Klone über die Northern-Blot Analyse durchgeführt werden.

Durch die PCR-Technik wird die Identifizierung von seltenen Transkripten ermöglicht (Liang et al., 1993; Liang & Pardee, 1992; Sharma & Davis, 1995). Aus diesem Grund wäre möglicherweise eine quantitative RT-PCR im Vergleich zur Northern-Blot Analyse besser zur Bestätigung der differentiellen cDNA-Fragmente geeignet (Ikononov & Jacob, 1996; Nordqvist & Tohonen, 1997; Eschelbach et al., 1998).

Die Vorteile der Differentiellen Display RT-PCR liegen eindeutig darin, daß:

- Eine gleichzeitige Analyse der induzierten, reprimierten und unveränderten Genexpression möglich ist.
- Geringes Ausgangsmaterial an RNA ausreichend ist (0.2 µg Gesamt-RNA bzw. 0.1 µg poly (A)⁺-RNA).
- Es sich im Vergleich zum substraktiven Hybridisieren und Screenen um eine zeitsparende Methode handelt; sie führt schnell zur Isolierung der differentiellen cDNA-Fragmente.
- Die differentiellen cDNA-Fragmente isoliert, reamplifiziert und kloniert werden: diese können als Hybridisierungsprobe für die Northern-Blot Analyse und ebenso zum Durchsuchen von cDNA- oder genomischen Banken für die Isolierung interagierender Gene eingesetzt werden.

Die Datenbankvergleiche der isolierten differentiellen Buchenklone nach erhöhter UV-B-Exposition unter Angabe der Bestätigung im Northern-Blot sind in Tab. 30 zusammengefaßt.

Tab. 30: Überblick über die Größe der Gene der Buchen-Klone (bp), der Transkripte, Angaben zur Homologie sowie Sequenzidentität und über die Verifizierung der Klone anhand der Northern-Blot Analyse (n.n. = nicht nachgewiesen; n.b. = nicht bestimmt, + = bestätigt, ohne Induktion bzw. Repression nach erhöhter UV-B-Exposition, UV-I = nach erhöhter UV-B-Exposition induziert).

Klon	Größe der cDNA (bp)	Größe des Transkriptes (bp)	Homologie	Sequenz-identität (%)	TIGR <i>Arabidopsis thaliana</i> -EST-Datenbank	Northern-Blot Analyse Bestätigung
UV-I 1/28-1	429	850	Ähnlichkeit zu ABI-3	63,6% (11 AS)	ET26738	UV-I
UV-I 1/28-2	377	589	Ribosomales Protein L37	52,9% (87 AS) ¹ 81,2% (48 AS)	TC9590	UV-I
UV-I 5/29-2	276	n.n.	Phytochrome regulated protein	50% (16 AS)	TC8143	n.n.
UV-I 12/28-4	286	1100	n.b.	n.b.	n.b.	UV-I
UV-I 10/28-2	550	n.b.	Ähnlichkeit zu Squalen-Synthase	58,8% (17 AS)	TC9889	n.b.
UV-R 1/28-1	323	1400	n.b.	n.b.	n.b.	UV-I
UV-R 2/28-1	419	1200	Nascent polypeptide associated complex alpha chain	78% (41 AS)	T44028	UV-I
UV-R 10/28-1	573	n.n.	Ähnlichkeit zu Peroxidase	39,1% (23 AS)	ET48503	n.n.
UV-R 10/28-3	489	n.b.	Ähnlichkeit zu DNA directed RNA-Polymerase alpha chain	52,9% (17 AS)	Q ATTS1802	n.b.
UV-R 12/28-1	430	2000	n.b.	n.b.	n.b.	+
UV-R 12/29-1	466	n.b.	Ähnlichkeit zu ara-3, ras-related GTP-binding	66,7% (9 AS)	P4155	n.b.

Die hier durchgeführten Northern-Blot Analysen belegten, daß mittels der DDRT-PCR UV-B-induzierte Klone isoliert wurden. Aufgrund der 2D-PAGE des löslichen Gesamtproteins und der *in vitro* translatierten Proteine wurden in erster Linie UV-B-reprimierte Klone erwartet. Die Sensitivität der PCR-Methode liegt wesentlich höher als die der *in vitro* Translation und der Silberfärbung. Aus diesem Grund entsprechen die UV-B-induzierten Klone zwar nicht den Erwartungen, aber sie ergänzen die aufgrund der *in vitro* Translation und Silberfärbung gelieferten Ergebnisse. Aus dem identischen Grund konnten die isolierten Klone auch nicht den Spots in der 2D-PAGE zugeordnet werden. Die Proteinspots, die in der 2D-PAGE nach UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle Induktion bzw. Reprimierung zeigten, reichten nicht zur Protein-Sequenzierung aus. Der Anteil der großen Unter-einheit der RubisCo am Gesamtprotein war der Grund dafür, daß keine größere Menge an Gesamtprotein bei der 2D-PAGE aufgetragen werden konnte. Deshalb war der Gehalt an den übrigen Proteinen nach der elektrophoretischen Auftrennung zu gering für die Protein Sequenzierung.

¹ Datenbankvergleich in der SWISS-PROT Datenbank P 49212

Ein großes Problem der DDRT-PCR ist einerseits, daß das Muster der differentiellen Expression oft nicht mittels des Northern-Blots bestätigt werden kann (Sun et al., 1994; Livesey & Hunt, 1998) und andererseits daß falsch Positive mit einer Häufigkeit von größer als 70% Wahrscheinlichkeit auftreten können (Sompayrac et al., 1995; Hilgers et al., 1998). Möglicherweise könnte diese Problematik durch eine Transkriptionsanalyse mittels RT-PCR umgangen werden (Ikonomov & Jacob, 1996; Nordqvist & Tohonon, 1997; Eschelbach et al., 1998).

Ein Großteil der durch die DDRT-PCR isolierten Buchen-Klone konnten dadurch, daß vermutlich Teilsequenzen im nicht-kodierenden Bereich geliefert wurden, nicht identifiziert werden. Die in die DDRT-PCR eingesetzten Primer binden zum einen an die 3'-Region der cDNA und an eine unbekannte Region in der Sequenz, dadurch werden durch diese Methode häufig unbekannte Sequenzbereiche amplifiziert (Blanchard & Cousins, 1996; Wilkinson et al., 1995). Kiiskinen et al. (1997) konnten den durch die DDRT-PCR isolierten Birken-Klon mittels Durchsuchen einer vorhandenen Birken Genbank identifizieren. In der vorliegenden Arbeit konnte auf keine Buchen Genbank zugegriffen werden.

Die hier angewandte Methode des Differentiellen Displays basierte auf dem aktuellen Stand der Wissenschaft zu diesem Zeitpunkt.

6. UV-B-induzierte Buchenklone mit geringen Homologien in der Datenbank

Die Sequenzen folgender Klone zeigten geringe Ähnlichkeiten im TIGR *Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbankvergleich: es wurden insgesamt 6 Buchenklone mit geringer Ähnlichkeit in der Datenbank identifiziert. Die Klone UV-I 1/28-1, UV-I 12/28-4, UV-R 1/28-1 und UV-R 12/28-1, die geringe Homologien in der TIGR *Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbank lieferten, wurden in der Northern-Blot Analyse als UV-B-induzierte Klone verifiziert. Mit den Klonen UV-I 10/28-2, UV-R 10/28-3 und UV-R 12/29-1 wurde keine Northern-Blot Analyse durchgeführt, weshalb keine positive Bestätigung möglich ist. Die RNA-Blot Analysen mit den Klonen UV-I 5/29-2 und UV-R 10/28-1 lieferten keine Signale, weshalb bei diesen Klonen ebenfalls keine Verifizierung erfolgen konnte. Benito et al. (1996) isolierten mittels DDRT-PCR einen Klon, der bei Pflanzen-Pilz Interaktionen eine Rolle spielt; dieser Klon wurde zwar auf Northern-Blot Ebene bestätigt, konnte aber durch die Sequenzanalyse und den anschließenden Datenbankvergleich nicht identifiziert werden. Ebenso zeigten Blanchard & Cousins (1996), daß lediglich 11 von insgesamt 19 Klonen mittels Northern-Blot Analyse detektiert wurden. Mason & Davis (1997) unterteilten die mittels DDRT-PCR isolierten Klone in 3 Gruppen: erstens positive Klone, die das erwartete Expressionsmuster auf den Northern-Blot Analysen bestätigen; zweitens falsch positive Klone und drittens aufgrund des fehlenden Signals auf Northern-Blot Ebene nicht interpretierbare Klone.

Somit ist die Aussagekraft der DDRT-PCR Methode zwingend an die Bestätigung mittels Northern-Blot Analysen gebunden. Eine RT-PCR wäre für die Bestätigung der nur geringfügig induzierten oder reprimierten Transkripte besser geeignet (Ikononov & Jacob, 1996; Nordqvist & Tohonen, 1997; Eschelbach et al., 1998). Allerdings stellt sich die Frage der physiologischen Relevanz für geringfügige Änderungen auf Genexpressionsebene.

6.1. UV-I 1/28-1 zeigte in der Datenbank Homologien zu „ABI-3“

Der aus der Buche isolierte Klon UV-I 1/28-1 zeigte in der Datenbank Homologien zu „ABI-3“. Die Identität in der Sequenz liegt in 11 AS bei 63,6%. Das Transkript dieses Klon wurde nach 3 und 6 h UV-B-Exposition induziert. Aufgrund der Northern-Blot Analyse wird bestätigt, daß die Genexpression bereits nach 6 h UV-B gegenüber der Starklicht-Kontrolle erhöht ist und nach einer anschließenden 4-stündigen Exposition unter Starklicht ohne UV-B die maximale Induktion erreicht (s. Abb. 43). Aufgrund der 3-fach erhöhten Induktion des Transkriptes zum Erntzeitpunkt 5 wurde der Klon UV-I 1/28-1 infolge der UV-B-Exposition eindeutig transient induziert.

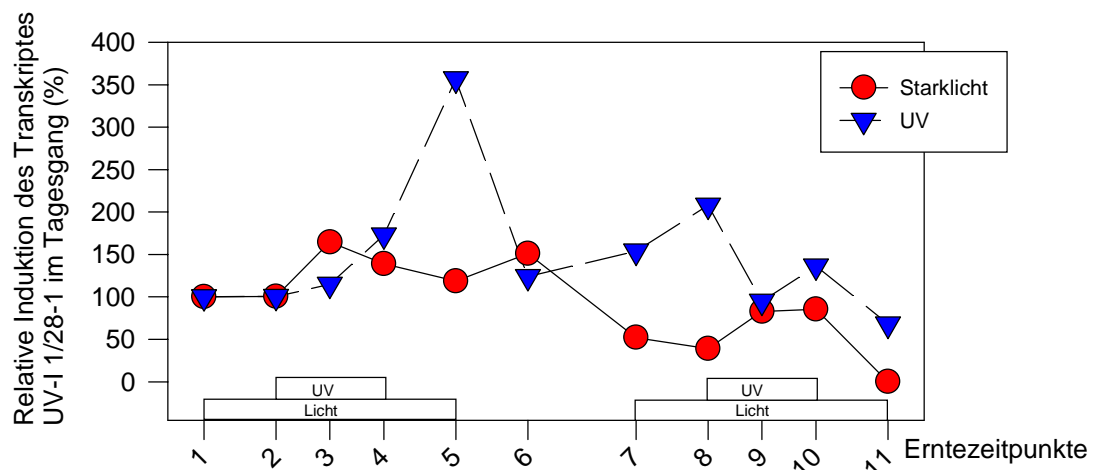


Abb. 43: Relative Induktion (%) des Transkriptes UV-I 1/28-1 unter Starklicht ohne und mit erhöhter UV-B-Exposition ($UV-B_{BE}$ 430 $mW\ m^{-2}$) aus E 4. Es wurde die RNA aus Mischproben isoliert ($n=6$) und für die Northern-Blot Analyse eingesetzt. Die Pflanzen wurden täglich 6 h unter erhöhtem UV-B exponiert: Ernte 3 und 4 sowie Ernte 9 und 10; anschließend wurden die Pflanzen unter Starklicht exponiert und unterlagen einem Tag-Nacht-Rhythmus.

Koornneef et al. (1984) beschrieben in *Arabidopsis* 3 genetisch verschiedene Abscisinsäure-unempfindliche Loci –ABI-1, ABI-2 und ABI-3-. Das Phytohormon Abscisinsäure spielt eine große Rolle bei der Regulation physiologischer Prozesse, wie Transpiration und Adaption an Umweltstressituationen (Davies & Jones, 1991). Abscisinsäure-unempfindliche Mutanten wurden unter anderem aus Mais (Viviparous 1, Robichaud et al., 1980) und *Arabidopsis* (ABI-1, ABI-2, ABI-3, Koornneef et al., 1984) isoliert. McCarty et al. belegten 1991 eine

Region des ABI-3 mit positiven Ladungen, die möglicherweise eine Helixform bilden und mit der DNA interagieren können. Es existieren weitere konservierte Regionen in ABI-3, die darauf hindeuten, daß das ABI-3 Protein mit DNA wechselwirkt (Giraudat et al., 1992). Die Charakterisierung des ABI-3 Proteins führt zur Hypothese, daß das ABI-3 Protein an der Abscisinsäure-regulierten Genexpression während der Samenentwicklung beteiligt ist (Giraudat et al., 1992) und die Sensitivität des Sämlingswachstums gegenüber Abscisinsäure kontrolliert (Koornneef et al., 1989). Letztendlich kann ABI-3 als Aktivator der Transkription betrachtet werden (Parcy & Giraudat, 1997).

6.2. UV-I 5/29-2 zeigte in der Datenbank Homologien zu einem „phytochrome regulated gene“

Die Sequenz dieses durch UV-B-Exposition induzierten Klons zeigt in der TIGR *Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbank Homologien zu einem Phytochrom-regulierten Gen (Newman et al., 1994). Die Identität der Sequenz liegt in 16 AS bei 50%. Beim Phytochrom-abhängigen Signaltransduktionsweg zur lichtabhängigen Genaktivierung sind G-Proteine und/oder Calcium/Calmodulin involviert (Quail et al., 1995; Neuhaus et al., 1997). Neuhaus et al. (1997) beschrieben die lichtabhängige Repression des Gens Asparagin-Synthetase vermittelt durch Phytochrom A. Auf der Suche nach dem Regulationsmechanismus des identischen Signaltransduktionsweges für die Induktion und Repression verschiedener Antworten auf Genebene, konnte ein 17bp cis-Element des Asparagin-Synthetase-Promotors identifiziert werden; vermutlich interagiert dieses 17 bp Element mit dem Phytochrom-gebildeten Repressor, dessen Regulation wiederum über Calcium und cGMP erfolgt (Neuhaus et al., 1997). Ebenso könnte durch bestimmte Promotorelemente eines Gens eine UV-B-abhängige Induktion ausgelöst werden (Kaiser et al., 1995).

Kunkel et al. (1996) gaben Hinweise, daß eine Interaktion einzelner Photorezeptoren über eine Signaltransduktionskaskade möglich wäre. Die Chalkonsynthese-Induktion konnte in verschiedenen Pflanzen über unterschiedliche lichtabhängige Signaltransduktionskaskaden stattfinden (Frohnmeier et al., 1997): in Petersilie ausgelöst durch den UV-B-vermittelten Signaltransduktionsweg und in Sojabohne und Tomate durch den Phytochrom-abhängigen Weg. Die Regulation der Chalkonsynthese-Expression erfolgte somit in erster Linie durch Phytochrom A und dem Blaulicht-UV-Photorezeptor (Schäfer et al., 1997). Kim et al. (1998) postulierten bei der UV-B-induzierten Photomorphogenese von *Arabidopsis thaliana* entweder eine Beteiligung von Phytochrom A oder Phytochrom B. Diese mögliche Wechselwirkung verschiedener Photorezeptoren über eine Signaltransduktionskaskade bestärkt die Induktion eines Phytochrom-regulierten Gens bei der Buche nach UV-B-Exposition.

Die Induktion dieses Buchen-Klons müßte noch durch eine Northern-Blot Analyse belegt werden.

6.3. UV-I 10/28-2 zeigte in der Datenbank Homologien zur „Squalen synthase“

In der TIGR *Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbank zeigte die Sequenz dieses UV-B-induzierten Klons Homologien zur Squalen-Synthase. Der Sequenzvergleich ergab bei 17 AS eine 58,8%-ige Identität. In der Literatur wurde bisher noch kein Zusammenhang zwischen UV-B-Behandlung und Squalen-Synthase beschrieben. Ebenso gibt es keine Arbeit, die die Induktion von Radikalen und Squalen-Synthase beschreibt. Ein Zusammenhang zwischen Ozon und dem Vorstufenzym der Squalen-Synthase, der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase, wurde in der Literatur bereits beschrieben (Wegener et al., 1997).

Squalen entsteht durch die Bindung zweier C₁₅-Einheiten des Farnesyldiphosphats und ist in den Metabolismus der Triterpene involviert. Der Synthese des Squalens ist die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase im Stoffwechsel vorgeschaltet. Die Induktion eines 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase-Transkriptes (1,95 kb) nach Ozon wurde bereits von Wegener et al. (1997) in *Pinus sylvestris* L. belegt; ebenso wurde die Repression eines 1,2 kb 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase-Transkriptes gezeigt. Wegener et al. (1997) führen eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der beiden Transkripte an: da die Ozon-Behandlung in Pflanzen die Steigerung der Transkripte der cytosolischen Abwehrenzyme bedingt (Kangasjärvi et al., 1994), könnte das 1,95 kb Transkript im Cytosol vorliegen; aufgrund der Arbeiten von Bahl & Kahl (1995) und Reddy et al. (1993), die die Abnahme der Kern-kodierten Chloroplasten-Proteine belegen, könnte das 1,2 kb Transkript im Chloroplasten lokalisiert sein.

Learned zeigte 1996, daß die Expression der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase durch Licht in *Arabidopsis thaliana* unterdrückt wird; zur Reprimierung des Transkriptes ist folglich eine kontinuierliche Beleuchtung notwendig. Die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase folgt im Isopren-Metabolismus im Anschluß an die der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase.

Back et al. (1998) fanden infolge einer UV-Behandlung in abgelösten Blättern von *Capsicum annuum* (Pfeffer) die Induktion der Sesquiterpen-Cyclase auf Transkript- und Enzymaktivitätsebene. Dieses Enzym ist im Isoprenoid-Metabolismus für die Synthese des Phytoalexins Capsidiol notwendig.

Da der vorliegende Buchenklon nicht in eine Northern-Blot Analyse eingesetzt wurde, erfolgte keine Verifizierung des Klons. Es wäre durchaus vorstellbar, daß aufgrund der UV-B-Exposition die Squalen-Synthase als Schlüsselenzym zur Bildung anderer wie bisher

beschriebener Sekundärstoffe induziert wird. Allerdings muß die Funktion der Squalen-Synthase bei UV-B-Exposition noch genauer untersucht werden.

7. UV-B-reprimierte Buchenklone mit geringer Ähnlichkeit

7.1. UV-R 10/28-1 zeigte in der Datenbank Homologien zu „Peroxidase“

Die poly (A)⁺-RNA des isolierten Buchenklons wurde nach 3 und 6 h UV-B-Behandlung gegenüber der entsprechenden Starklicht-Kontrolle reprimiert. Über den Induktionsverlauf auf Transkriptebene im zeitlichen Verlauf liegen keine Daten vor, da die Northern-Blot Analyse basierend auf Gesamt-RNA negativ verlief. Der Sequenzvergleich des Klon in der TIGR *Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbank zeigte eine geringe Ähnlichkeit zur Peroxidase. Der Datenbankvergleich ergab in 23 AS eine 39,1%-ige Identität der Sequenzen.

Abiotischer Streß wird durch das antioxidative Verteidigungssystem abgeschwächt. Dieses besteht aus Antioxidantien und Enzymen, wie Superoxiddismutasen, Katalasen und Peroxidasen. Peroxidasen sind Hämproteine, die die Oxidation verschiedener Substrate katalysieren, indem sie H₂O₂ nutzen und zu Wasser reduzieren. H₂O₂ kann in Anwesenheit von radikalen Sauerstoffanionen und Spuren von Transitionsmetallen rasch zu toxischen Hydroxylradikalen umgewandelt werden (Halliwell, 1987). Deshalb ist zum Vermeiden oxidativer Schäden die schnelle Detoxifikation sowohl radikaler Sauerstoffanionen als auch von H₂O₂ notwendig. In höheren Pflanzen sind Peroxidasen ubiquitär verfügbar und bei der Lignifikation, beim Auxinmetabolismus und anderen Metabolismen beteiligt (Converso & Fernández, 1995).

7.2. UV-R 10/28-3 zeigte in der Datenbank Homologien zu „DNA directed RNA-Polymerase alpha chain“

Der nach 3 und 6 h UV-B-reprimierte Klon UV-R 10/28-3 zeigte in der TIGR *Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbank geringe Ähnlichkeiten zur „DNA directed RNA-Polymerase alpha chain“ (52,9% Identität in 17 AS). Die durchgeführte Northern-Blot Analyse verlief negativ, weshalb die notwendige Verifizierung nicht vorliegt. In der Literatur wurde dieses Gen bisher noch nicht in Zusammenhang mit UV-B beschrieben. Eine Abnahme des Transkriptes könnte durch die Abnahme der Transkriptionsrate oder durch den gesteigerten Abbau der Transkripte erklärt werden (Mackerness et al., 1997).

7.3. UV-R 12/29-1 zeigte in der Datenbank Homologien zu „ara-3, ras-related GTP-binding protein“

Der nach UV-B-Exposition reprimierte UV-R 12/29-1 isolierte Buchenklon ergab im Datenbankvergleich eine Homologie zum „ara-3, ras-related GTP-binding protein“ (66,7%-ige Identität der Sequenz in 9 AS). Das ara-Gen wurde aus *Arabidopsis* isoliert und zeigte

Homologien zur ras-verwandten Genfamilie (Matsui et al., 1989). Dieses ara-Protein wies ebenso wie die ras-Genfamilie konservierte Aminosäurereste zur Bindung von GTP, GTP-Hydrolyse und Membranbindung auf (Anai et al., 1991). 1996 wurden 3 kleine GTP-bindende Proteine aus Zuckerrübe isoliert (Dallery et al.); 2 dieser Klone zeigten Homologien zum ara-3 aus *Arabidopsis thaliana*. Aufgrund der starken Homologien wird deutlich, daß diese Proteine innerhalb der Pflanzenfamilien sehr konserviert sind. Möglicherweise spielen diese eine bedeutende Rolle bei den Transduktionswegen.

Frohnmeier et al. (1997) postulierten anhand von Petersilien-Protoplasten-Studien, daß bei der cGMP-induzierten Genexpression Phytochrom der Rezeptor ist und der UV-B-Lichtrezeptor Calcium/Calmodulin abhängig ist. Kunkel et al. (1996) schloßen eine Wechselwirkung zwischen den verschiedenen spezifischen Photorezeptoren über eine Signaltransduktionskaskade nicht aus. Die Repression des ara-3, ras-related GTP-binding proteins – isolierten Klons aus Buche könnte als weiterer Hinweis dafür gesehen werden, daß bei der UV-B-induzierten Signaltransduktionskaskade GTP-bindende Proteine involviert sind.

8. Buchenklone mit signifikanter Ähnlichkeit im Datenbankvergleich

8.1. UV-R 2/28-1 zeigte in der Datenbank große Homologien zur „nascent polypeptide associated complex alpha chain“

Der isolierte Klon UV-R 2/28-1 mit einer Länge von 1,2 kb ergab in der TIGR *Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbank große Homologien zu der „nascent polypeptide associated alpha chain“. Dieser Klon zeigte eine 78%-ige Identität der Sequenz in 41 AS. Diese Homologie zur nascent polypeptide associated alpha chain gibt einen weiteren Hinweis der Regulation auf Transkriptionsebene nach Behandlung mit UV-B, Ozon und UV-B mit Ozon kombinierter Behandlung.

Dieser Klon wurde aufgrund des Differentiellen Displays als nach 3 und 6 h UV-B-reprimierter Klon identifiziert. Nach Durchführung der Northern-Blot Analyse wurde der Klon aber als UV-B-induzierter Klon eingestuft. Diese Zuordnung erfolgte entsprechend der Unterteilung der mittels DDRT-PCR isolierten Klone von Mason & Davis (1997): 43% der Klone zeigten das erwartete Muster auf Northern-Blot Ebene, 30% der Klone waren falsch Positive und 26% der differentiellen cDNA-Fragmente waren aufgrund des fehlenden Signals in der Northern-Blot Analyse nicht interpretierbar. Blanchard & Cousins (1996) fanden zwar bei einigen differentiellen Klonen Homologien mittels der EST-Datenbank, konnten diese aber nur teilweise mittels Northern-Blot Analyse bestätigen. Einige Spezies der mRNA sind zu selten, um diese auf Northern-Blot Ebene zu detektieren (Liang et al., 1993; Utans et al., 1994).

Die unten dargestellte Northern-Blot Analyse belegt, daß das Transkript des Klons UV-R 2/28-1 nach bereits 3 h UV-B-Behandlung (Ernte 3) induziert wurde und während der Zeitkinetik im Vergleich zur Kontrolle (Starklicht-Behandlung) stets minimal induziert bleibt (s. Abb. 44).

In einer weiteren Northern-Blot Analyse blieb das Transkript des Klons UV-R 2/28-1 sowohl nach einer Ozon- als auch nach einer kombinierten Ozon- und UV-B-Exposition unverändert.; lediglich zum Erntezeitpunkt 5 zeigte sich im Vergleich zu Ozon ein 8,7-facher Anstieg des Transkriptes nach kombinierter UV-B/Ozon-Behandlung (s. Abb. 45).

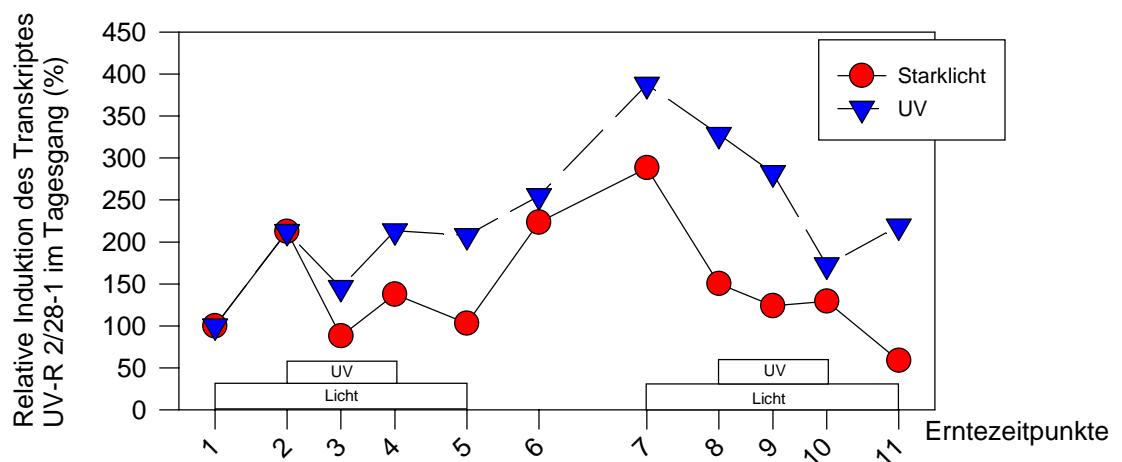


Abb. 44: Relative Induktion (%) des Transkriptes UV-R 2/28-1 unter Starklicht ohne und mit erhöhter UV-B-Exposition ($UV-B_{BE}$ 430 mW m^{-2}) aus E 4. Es wurde die RNA aus Mischproben isoliert ($n=6$) und für die Northern-Blot Analyse eingesetzt. Die Pflanzen wurden täglich 6 h unter erhöhtem UV-B exponiert: Ernte 3 und 4 sowie Ernte 9 und 10; anschließend wurden die Pflanzen unter Starklicht exponiert und unterlagen einem Tag-Nacht-Rhythmus.

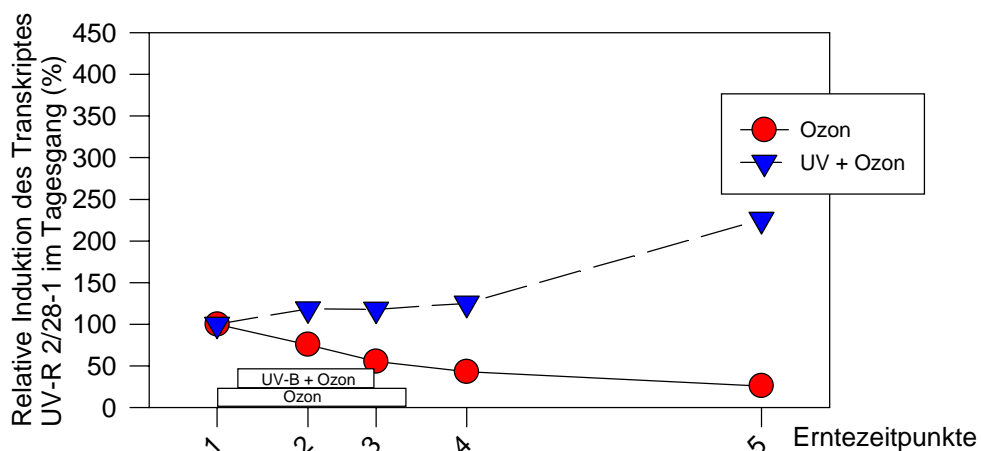


Abb. 45: Tagesgang des Transkriptes UV-R 2/28-1 unter Starklicht ($UV-B_{BE} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$; PAR $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mit erhöhter Ozon-Begasung (300 ppb, 8 h täglich) mit und ohne erhöhter UV-B-Exposition (E7: $UV-B_{BE}$ 390 mW m^{-2} ; PAR $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Es wurde die RNA aus Mischproben isoliert ($n=8$) und für die Northern-Blot Analyse eingesetzt.

Nach alleiniger Ozon-Behandlung hingegen war nahezu keine Veränderung des Transkriptes zu erkennen. Diese Daten geben Hinweise, daß das Transkript des Klons UV-R 2/28-1 unter Exposition eines einzelnen Stressors, wie Ozon, während einer kurzzeitigen Behandlung unverändert bleibt und unter UV-B kombiniert mit Ozon nach einer anfänglichen Latenzzeit zeitlich verzögert leicht induziert wird. Durch Kombination von UV-B/Ozon-Behandlung wird während der ersten 4 Erntezeitpunkte die allein durch UV-B-vermittelte Induktion erstmals aufgehoben. Das bedeutet, daß unter Kombination einzelner Streßfaktoren sich gegenseitig aufhebende Effekte auftreten können (s. Abb. 44 und 45).

Sowohl die Effekte von UV-B als auch von Ozon sind phytotoxisch, aber die Kombinations-effekte von Ozon und UV-B wurden bisher nur vereinzelt beschrieben: bei der kombinierten Exposition unter UV-B und Ozon bewirkte UV-B eine Reprimierung der Ozon-vermittelten Proteinakkumulation der Chitinase in Tabakpflanzen und keine Veränderung der Ozon-bedingten Induktion der β -1,3-Glukanase (Thalmair et al., 1996). Rao et al. (1995) zeigten anhand von *Arabidopsis thaliana*, daß die UV-B-vermittelte Bildung von Photosynthesepigmenten und die Induktion der Proteinbiosynthese durch Ozon gehemmt wurde. Zinser et al. (1998) belegten anhand von Studien an Primärnadeln von jungen Kieferkeimlingen die verstärkte Akkumulation des Ozon-induzierten Stilbensynthase-Transkriptes bei simultaner Behandlung von Ozon und UV-B. Desweiteren wurde gezeigt, daß Ozon in Kombination mit UV-B-Behandlung stärkere inhibitorische Effekte erzielen kann als Ozon oder UV-B als alleiniger Streßfaktor (Krupa & Kickert, 1989; Feder & Shrier, 1990). Bei Studien an Kiefern konnte gezeigt werden, daß zweifach ambiente Ozon-Konzentrationen kombiniert mit niedrigen UV-B-Bestrahlungen die Ozon-bedingte Erhöhung der Gehalte an Ascorbat und Katalase minimieren (Baumbusch et al., 1998).

Sowohl durch UV-B als auch durch Ozon entstehen aktivierte Sauerstoffspezies, die oxidative Schäden an Proteinen verursachen können (Rao et al., 1996). Die vorliegenden Daten der Primärblätter an Buchensämlingen deuten darauf hin, daß die Signaltransduktion nach Ozon- und UV-B-Behandlung über miteinander interagierende Wege erfolgt. Dies könnte einerseits eine Erklärung für die Aufhebung des reprimierenden Ozon-Effektes des UV-R 2/28-1-Transkriptes bei simultaner UV-B/Ozon-Exposition sein und andererseits die unterschiedlichen Effekte nach Ozon und UV-B-Exposition verursachen.

Yotov et al. (1998) postulierten bei mineralisierten Osteoblasten die transkriptionelle Coaktivator Funktion des nascent polypeptide associated complex. Hinweise dafür sind die Sequenzähnlichkeit zwischen dem alpha chain of the nascent polypeptide associated complex und transkriptionellen regulatorischen Proteinen und der Tatsache, daß der Heterodimerisationspartner als Transkriptionsfaktor BTF3b identifiziert wurde (Wiedmann et al., 1994). Der alpha chain of the nascent polypeptide associated complex interagiert mit den Aminosäuren 1 bis 89 des c-Jun Proteins; der Coaktivator zeigt sowohl mit der

unphosphorylierten als auch der Serin 73-phosphorylierten Form des c-Juns eine Wechselwirkung (Moreau et al., 1998). Die Jun N-terminale Kinase (JNK1) gehört zur Familie der Streß aktivierten Proteinkinasen, welche bei Keratinocyten auch durch UV-Strahlung aktiviert werden kann (Ramaswamy et al., 1998).

8.2. Das ribosomale Protein L37 - induziert durch erhöhte UV-B-Exposition

Das 589 bp umfassende Transkript des Buchen-Klons UV-I 1/28-2 zeigte hohe Homologien zu dem L37 Protein der Tomate und wurde zum ersten Mal bei der Buche beschrieben. Der Aminosäurevergleich von Klon UV-I 1/28-2 mit dem ribosomalen L37 Protein aus *Lycopersicon esculentum* L. (Tomate), *Homo sapiens* (Mensch), *Rattus norvegicus* (Ratte), *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) und *Leishmania infantum* ergab die hoch konservierten Sequenzbereiche (s. Abb. 46).

	1				50
P49212	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~GRCSACAYP	AARLRKYNWS
64p2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~DWS
P49166	~GKGTPSFGK	RHNKSHTLCN	RCGRRSFHVQ	KKTCSSCGYP	AAKTRSYNWG
P51402	~GKGTPSFGK	RHNKSHTLCN	RCGRRSFHVQ	KKTCSSCGYP	SAKTRSHNWA
P49622	MTKGTQAFGK	KHVKSHTLCK	RCGKSSFHIQ	KKRCASCGYP	DAKKRTYNWG
P02403	~TKGTSSFGK	RRNKTHTLCK	RCGSKAYHLQ	KSTCGKCGYP	AKRKRKYNWS
P39094	~TKGTTSMGQ	RHGRTHILCK	RCGRNSYHVQ	WERCAACAYP	RASRRRYNWS
	51				100
P49212	VKALRRKTTG	TGRMRYLRNV	PRRFKTNFRE	GTEAAPRKKG	TAAAS~~~~~
64p2	VKAIRRKTTG	TGRMRYMRNV	PRRFKSGFRE	GTQAAPRKKG	AAATA*GIIG
P49166	AKAKRRHTTG	TGRMRYLKHV	SRRFKNGFQT	GSASKASA~~	~~~~~
P51402	AKAKRRHTTG	TGRMRYLKHV	SRRFKNGFQT	GSAKATSA~~	~~~~~
P49622	AKSIRRRTTG	TGRTRHLRDV	NARFRNGFRE	GTPPKPRAQP	TN~~~~~
P02403	AKAKRRNTTG	TGRMRHLKIV	YRRFRHGFRE	GTPPKPKRAA	VAASSSS~~~
P39094	VKAIRRRRTG	TGRCRYLKVV	NRRIANHFKT	PKA~~~~~	~~~~~
	101				150
P49212	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
64p2	EWFLMM*FGY	QIAVFRSLSL	CWNWFYKGTV	*WVL*PYNLV	IFDLVQYVVA
P49166	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
P51402	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
P49622	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
P02403	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
P39094	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	151		172		
P49212	~~~~~	~~~~~	~~		
64p2	FILDKEYFKM	NSEFCFW*KK	KK		
P49166	~~~~~	~~~~~	~~		
P51402	~~~~~	~~~~~	~~		
P49622	~~~~~	~~~~~	~~		
P02403	~~~~~	~~~~~	~~		
P39094	~~~~~	~~~~~	~~		

Abb. 46: Aminosäurevergleich des ribosomalen Proteins L37 aus *Fagus sylvatica* L. mit *Lycopersicon esculentum* L., *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Leishmania infantum*. Die Proteinsequenzen für das Alignment stammen aus der SWISS-PROT-Datenbank; die Accession-Nummern sind nachfolgend angegeben: *Lycopersicon esculentum* (P 49212), *Homo sapiens* und *Rattus norv.* (P 02403), *Caenorhabditis elegans* (P 49622), *Saccharomyces cerevisiae* (P 51402 und P 49166), *Leishmania infantum* (P 39094) und *Fagus sylvatica* L. (64p2). Die hoch konservierten AS sind markiert. Die Sequenzen wurden in der EMBL-Datenbank verglichen. * kennzeichnen Stop-Codons in der Buchen-Sequenz und die Nummern die AS-Position jedes Proteins.

Der von Werner et al. (1995) beschriebene Tomaten-Klon kodiert für ein Protein, das dem 60S ribosomalen Protein L37 homolog ist. Die Proteinsequenz des Buchen-Klons UV-I 1/28-2 lieferte in 50 von insgesamt 129 AS eine lückenlose Übereinstimmung mit dem von Werner et al. publizierten L37 Klon.

In der TIGR *Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbank konnte eine 81,2%-ige Identität in 48 AS gefunden werden. Die Ähnlichkeit zu *Lycopersicon esculentum* L. liegt bei 87,5%, zu *Homo sapiens* (60S) und *Rattus norvegicus* 75% (60S) und 70% zu *Caenorhabditis elegans* (möglicherweise 60S).

Bekannte Sequenzen von pflanzlichen ribosomalen Proteinen stammen meist aus Organellen und eine Minderheit präsentiert nukleare Gene. Zum ersten Mal wurde die komplette cDNA-Sequenz des ribosomalen Proteins L37 in Pflanzen von Werner et al. (1995) beschrieben. Die L37 mRNA wurde über Expressions-Studien in sehr jungen Blättern der Tomate, aber auch in älteren Blättern nachgewiesen.

Die Verrechnung der Proteinsequenzdaten in einem Stammbaum verdeutlicht, daß sich die pflanzlichen L37 Proteine zu sehr frühen Zeiten phylogenetisch von denen der *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Leishmania infantum* abzweigten (s. Abb. 47).

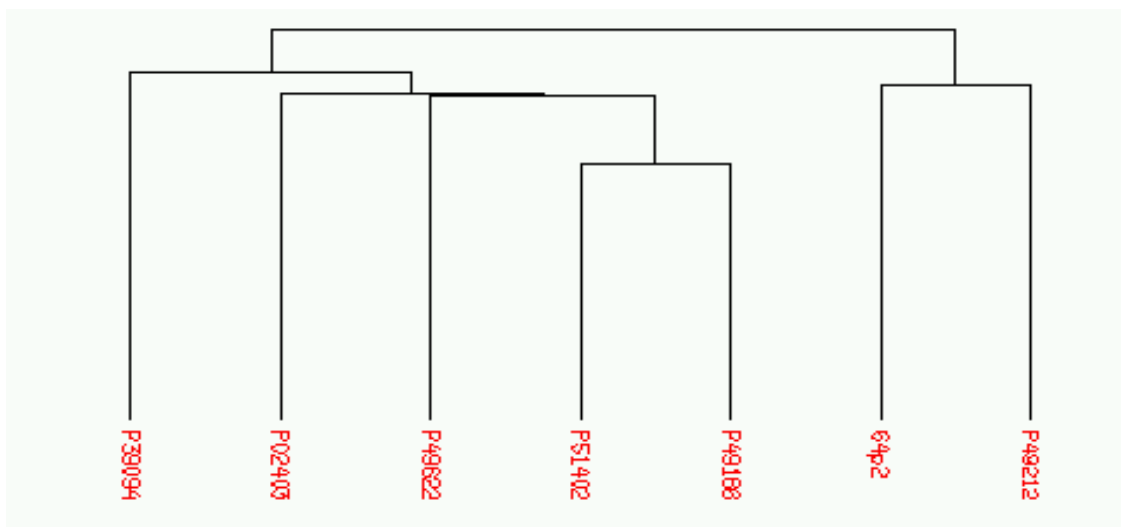


Abb. 47: Stammbaum des ribosomalen L37 Proteins mit *Lycopersicon esculentum* (P 49212), *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus* (P 02403), *Caenorhabditis elegans* (P 49622), *Saccharomyces cerevisiae* (P 51402 und P 49166) und *Leishmania infantum* (P 39094) und *Fagus sylvatica* L. (64p2); die Proteinsequenzen für die Berechnung stammen alle aus der SWISS-PROT-Datenbank. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der EMBL-Datenbank durch das Programm Pile-up.

Das 60S ribosomale Protein L37 blieb während der Evolution der Eukaryoten hoch konserviert (s. Abb. 47). Die Funktion und Position des L37 Proteins im eukaryotischen Ribosom ist jedoch noch unklar.

Die Kern-kodierte mRNA wird über die cytoplasmatischen 80S Ribosomen translatiert, die sich aus 40S und 60S Ribosomen-Untereinheiten zusammensetzen. Diese Ribosomen-Untereinheiten besitzen verschiedene rRNA-Komponenten, nämlich die 5S, 18S, 5,8S und 25S. Die für die 18S, 5,8S und 25S rRNA-kodierenden Gene können bei vielen Pflanzen einen hohen Anteil am Gesamtgenom einnehmen (Hemleben et al., 1988). Die Anzahl der ribosomalen RNA-Gene kann bei Arten einer Familie und bei Varietäten einer Art sehr unterschiedlich sein. Bei Pflanzen wurden in den letzten Jahren einige cytoplasmatische r-Protein-cDNA-Klone isoliert. Dabei wird unterschieden zwischen „small“ Untereinheit r-Protein Genen (S3a, S8, S11, S13, S14, S15a, S16, S18, S19) und den „large“ Untereinheit r-Protein Genen (L2, L3, L5, L7a, L7, L16, L17, L21, L25, L34, L27, L31 und L37) (Dai et al., 1996).

8.2.1. Mögliche Funktionen des ribosomalen Proteins

Die Proteinbiosynthese ist ein Grundprozeß in allen bekannten Organismen. In Pflanzen existieren Ribosomen im Cytosol, Mitochondrien und Plastiden. Funktionen über ribosomale Proteine bei Pflanzen sind weit weniger bekannt als bei niedrigen Eukaryonten und Säugern. Die Genexpression cytosolischer ribosomaler Proteine wurde bisher vor allem in Säugern und Hefe studiert. Es wurde gezeigt, daß die Genexpression der ribosomalen Proteine während der Entwicklung koordiniert reguliert wird. Der Regulationsweg variiert nicht nur in Abhängigkeit vom Organismus, sondern auch von den verschiedenen Entwicklungsstufen des einzelnen Organismus (Planta und Raue, 1988; Sangwan et al., 1993). Einen Überblick über die extraribosomale Funktion der ribosomalen Proteine gab Wool (1996).

Die Expressionsmuster von einigen cytoplasmatischen ribosomalen Proteingenen wurden untersucht. Die mRNA-Anteile der ribosomalen Proteine sind in mitotisch aktiven Geweben, wie z.B. Wurzelspitzen, weiblichen Blütenständen und Knoten, wesentlich höher als in bereits ausdifferenzierten Geweben: S13 im Mais (Joanin et al., 1993), S15a in *Brassica napus* (Bonham-Smith et al., 1992) und S18 in *Arabidopsis thaliana* (Lijsebettens et al., 1994). Untersuchungen mit transgenem Tabak belegten, daß die rpL34-Promotor-Aktivität in aktiv wachsenden Geweben, einschließlich Meristemen, Blütenorganen und sich entwickelnden Früchten, sehr hoch ist (Dai et al., 1996). Die Induktion der translatierbaren mRNA-Level von cytoplasmatischen ribosomalen Proteingenen - der L25 und L34 mRNA-Mengen - kann aber auch durch exogene Stimuli ausgelöst werden: im Tabak durch mechanische Verwundung, 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure und Benzyladenin (Gao et al., 1994). Dai et al. (1996) zeigten, daß bei Tabak durch mechanische Verwundung, Wachstumsregulatoren, 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure und Benzyladenin die rpL34 Promotor-Aktivität gegenüber Kontrollpflanzen um das 5-fache anstieg; der Promotor besitzt ein regulatorisches Element, welches unter anderem durch Auxin und Salicylsäure induziert wird. Gantt & Key (1985) berichteten über die Induktion der Transkripte der cytoplasmatischen r-Proteingene durch

Auxin im Sojabohnen-Hypokotyl. Perez et al. (1990) fanden Hinweise, daß Auxin die r-Proteine auf Translationsebene kontrolliert, indem es die Regulation des phosphorylierten Zustandes der ribosomalen Proteine beeinflusst; detaillierte Mechanismen sind jedoch noch nicht bekannt.

Nach UV-B-Exposition wurde der Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies beschrieben; dieser wird häufig durch die Akkumulation der Salicylsäure begleitet (Surplus et al., 1998). Infolge von Pathogenbefall wurden bereits hohe Salicylsäuregehalte als Pflanzenantwort beschrieben (Klessig & Malamy, 1994). Yalpani et al. (1994) zeigten zwar in UV-B- und UV-C-behandelten Pflanzen einen Anstieg der Salicylsäure, jedoch ist die Rolle der Salicylsäure im UV-B-Signalweg bisher noch unklar.

In Buchensämlingen wurde das L37 Proteingen sowohl durch die exogenen Stimuli - UV-B und Ozon – induziert (s. Abb. 48 und 49). Nach insgesamt 6-stündiger UV-B-Behandlung (Ernte 5) zeigte dieses Transkript die maximale Induktion (3,5-fach).

In einer weiteren RNA-Blot Analyse wurde das Transkript des Klons UV-I 1/28-2 unter Starklicht mit erhöhter Ozon-Behandlung gegenüber Starklicht mit ambienter Ozon-Konzentration induziert. Die maximalen Induktionen des Transkriptes wurden zur Ernte 3 und Ernte 6 nach erhöhter Ozon-Exposition im Vergleich zu ambienter Ozon-Behandlung erreicht (s. Abb. 49). Die erste maximale 1,3-fache Induktion scheint direkt mit der Dauer der Ozon-Exposition (Ernte 1-3) gekoppelt zu sein. Die Induktion des ribosomalen Proteingens L37 nahm im Verlauf der Zeitkinetik wieder ab und zeigte zur Ernte 6 ein erneutes Maximum (Faktor 1,6). Dieses zweite Maximum korreliert mit den Ozon-Schäden bei der Buche. Zu diesem Zeitpunkt wurden bei den jungen Trieben der Buchensämlinge nekrotische Flecken nachgewiesen (s. III.3.3.3.). Ozon-Schäden resultieren aus Radikalen, die durch Reaktion mit Ozon im Cytoplasma entstehen; diese Oxyradikale können Lipid- und Proteinkomponenten der Membran angreifen. Der initiale Angriffspunkt in der Zelle ist die Plasmamembran (Heath, 1987). Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale, die durch Ozon im Apoplasten entstehen, können intakte Membranen bis zur völligen Schädigung durchdringen. Sobald diese in die Zelle gelangt sind, können sie weiter mit zellulären Komponenten reagieren. Die Lipidperoxidation und Schädigung der Plasmamembran begründen den oxidativen Stress in der Zelle (Bahl et al., 1993). Die Entstehung der nekrotischen Symptome belegen, daß die Plasmamembran der Zellen lysiert wurde (Pitcher & Zilinskas, 1996).

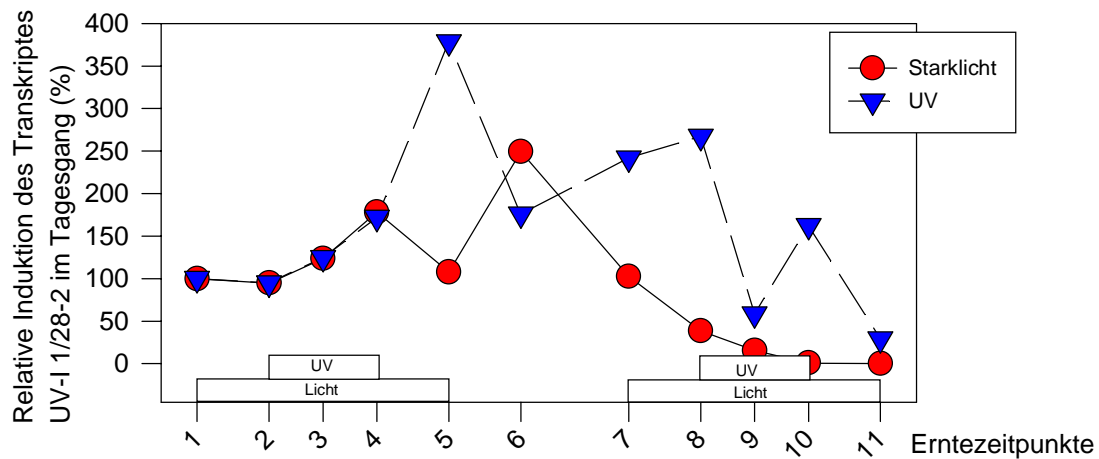


Abb. 48: Die relative Induktion (%) des Transkriptes UV-I 1/28-2 unter Starklicht ohne und mit erhöhter UV-B-Exposition ($UV-B_{BE}$ 430 mW m^{-2}) aus E 4. Es wurde die RNA aus Mischproben isoliert ($n=6$) und für die Northern-Blot Analyse eingesetzt. Die Pflanzen wurden täglich 6 h unter erhöhtem UV-B exponiert: Ernte 3 und 4 sowie Ernte 9 und 10; anschließend wurden die Pflanzen unter Starklicht exponiert und unterlagen einem Tag-Nacht-Rhythmus.

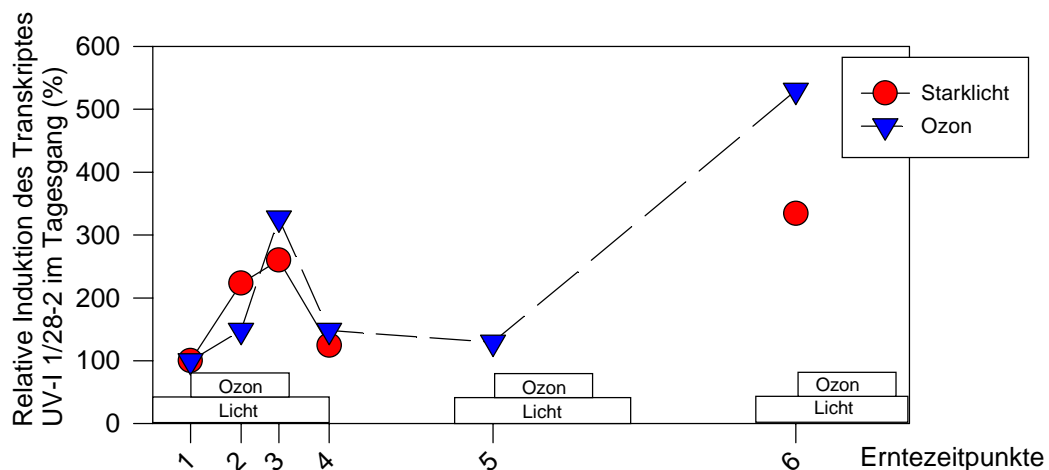


Abb. 49: Der Tagesgang des Transkriptes UV-I 1/28-2 unter Starklicht ohne und mit erhöhter Ozon-Begasung im Vergleich. Die Exposition der Pflanzen erfolgte unter Starklicht (E_5 : $UV-B_{BE} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$; PAR $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) mit ambienster Ozon-Konzentration oder erhöhter Ozon-Begasung (300 ppb, 8 h täglich). Es wurde die RNA aus Mischproben isoliert ($n=10$) und für die Northern-Blot Analyse eingesetzt.

Bereits Eckey-Kaltenbach et al. (1994) beschrieben nach Ozon-Exposition ähnliche Effekte bei *Petroselinum crispum* L.: nach 6 h und 48 h wurden die zwei maximalen Induktionslevel des Transkriptes der Phenylalanin-ammonium-lyase sichtbar, wobei der zweite mit der Nekrosenbildung korrelierte.

Die oben dargestellten Daten belegen, daß durch Behandlung mit exogenen Stimuli, wie UV-B und Ozon, bei Buchensämlingen eine Regulation auf Transkriptionsebene stattfinden muß.

Unter beiden Expositionen wurde eine Induktion des Transkriptes bei Ozon zur Ernte 3 (7 h Ozon-Behandlung) und bei UV-B zur Ernte 5 (6 h UV-B-Exposition) gezeigt.

Carper et al. (1999) gaben anhand von Studien bei humanen epithelialen Linsenzellen Hinweise dafür, daß infolge einer Behandlung mit Hydrogenperoxid oxidativer Stress vermittelt wurde. Dieser bewirkte die Repression verschiedener Transkripte, wie z.B. der NADH-Dehydrogenase, Cytochrom b, Cytochrom-Oxidase III und 16S rRNA.

Revenkova et al. (1999) führten Studien mit *Arabidopsis* Mutanten durch, die in einem der 3 Promotoren des S27 ribosomalen Gens eine Deletion trugen. Infolge einer UV-Exposition war diese Mutante unfähig, Transkripte rasch abzubauen. Tishkoff et al. (1991) zeigten, daß *Saccharomyces cerevisiae* Zellen, welchen die cytoplasmatische 5'-3'Exoribonuklease XRN1 (auch als SEP1 bekannt) fehlte, gegenüber UV sensibler sind. Revenkova et al. (1999) belegten die Induktion der raschen Abnahme des mRNA-Gehaltes durch UV-Strahlung. Dies erklärt die Beteiligung der RNase-Aktivität als unmittelbare Antwort der Nukleinsäureschädigung. Das S27a Protein ist einerseits an der Reifung der rRNA (Baudin-Baillieu et al., 1997) und andererseits am Abbau der geschädigten Transkripte beteiligt.

Bisher gibt es eine einzige Arbeit (Abts et al., 1997), in der nach UV-B-Exposition die Induktion ribosomaler Proteine beschrieben wurde. Die Induktion des HUI 13 cDNA-Klons wurde bei humanen Keratinocyten nach UV-B-Exposition nachgewiesen. Dieser Klon ergab Homologien zu dem sauren ribosomalen Phosphoprotein P0, welches für die DNA-Reparatur notwendig ist. Das P0 Protein ist auch in humanem Dickdarm-Krebsgewebe überexprimiert (Barnard et al., 1994) und es ist bekannt, daß P0 phosphoryliert wird. Barnard et al. (1994) zeigten, daß die mRNA des humanen ribosomalen Proteins L37 in humanen Dickdarm-Krebsgewebe überexprimiert wird. Die L37 mRNA war ca. 375 Nukleotide lang, die 97 AS kodierten und hatte ein MG von 11,07 kDa mit einem pI von 12,6. Dieses humane L37 besitzt multiple potentielle Orte der Serin/Threonin-Phosphorylierung basierend auf Konsensusmotifen für die cGMP-, cAMP- oder Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase oder Proteinkinase C; möglicherweise ist das phosphorylierte L37 Protein für die Überexpression verantwortlich. Diese Motife des L37 könnten durchaus in Zusammenhang mit dem postulierten UV-B-lichtabhängigen Signaltransduktionsweg diskutiert werden. Frohnmeier et al. (1997) unterschieden anhand von Chalkonsynthase-Expressionsstudien zwischen der Phytochrom-vermittelten und UV-B-vermittelten Induktion; in *Petersilie* wird die Chalkonsynthase-Induktion nach UV-B-Exposition durch Calcium, Calmodulin und Serin/Threonin Proteinkinase-Aktivität reguliert. Durch die oben beschriebenen Konsensusmotife könnte das L37 Protein möglicherweise in den UV-B-Signaltransduktionsweg involviert sein.

Diese Arbeit beinhaltet grundlegende Vorarbeiten für die Identifizierung differentiell exprimierter Gene bei der Buche infolge erhöhter UV-B-Exposition. Es wurde zum ersten Mal die UV-B-vermittelte Induktion des „nascent polypeptide associated complex alpha chain“ und des ribosomalen Proteins L37 bei der Buche beschrieben. Zur Identifizierung der kompletten Gensequenzen müßte nachfolgend eine Buchen-cDNA-Bibliothek erstellt werden; mittels dieser Buchen-cDNA-Bibliothek könnten Klone mit der vollständigen kodierenden Sequenz der hier beschriebenen differentiellen cDNAs isoliert werden (Porta et al., 1999). Insbesondere das „nascent polypeptide associated complex alpha chain“ und das ribosomale Protein L37 könnten künftig als Marker-Gene bei der Buche *Fagus sylvatica* L. nach UV-B-Exposition verwendet werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, Veränderungen innerhalb weniger Stunden nach UV-B-Exposition auf Protein- und Transkriptionsebene bei 10-wöchigen Buchensämlingen *Fagus sylvatica* L. zu analysieren. Dazu wurden Buchensamen unter standardisierten Bedingungen angezogen und von dem Zeitpunkt der Keimung an unter einem UV-B/PAR-Verhältnis exponiert, das den natürlichen Umweltbedingungen sehr ähnlich ist. Die UV-B-Exposition der 10-wöchigen Buchensämlinge erfolgte in einer UV-B-Pflanzenkammer, die das Lichtspektrum des Sonnenlichts simulierte. Die in einer Zeitkinetik geernteten Primärblätter dienten als Ausgangsmaterial für die Daten in der vorliegenden Arbeit. Die 2D-PAGE der löslichen Gesamtproteine und *in vitro* translatierten Proteine wurde stets zweifach durchgeführt und jeweils die Gele mit der besten Auflösung als Einzelbestimmung ausgewertet.

Die Untersuchungen auf Ebene des löslichen Gesamtproteins der Buche *Fagus sylvatica* L. erfolgten mittels einer Zeitkinetik über 1 Woche, wobei täglich 1 mal geerntet wurde. Die 2D-PAGE Analyse ergab über die gesamte Zeitkinetik betrachtet 1 UV-B-induziertes Protein gegenüber der Starklicht-Kontrolle: Protein 28 (17 kDa; pI 6,8). Die 2D-Analysen auf löslicher Gesamtproteinebene stimmten mit den Daten auf *in vitro* Translationsebene überein, wobei die Effekte auf Transkriptionsebene wesentlich stärker waren. Insbesondere nach 3 und 6 h UV-B-Exposition konnten auf Transkriptionsebene eine 60%-ige und 90%-ige Reprimierung gezeigt werden. Diese Reprimierung war transient und auf Proteinebene in geringerem Ausmaß zeitlich verzögert nachzuweisen. Diese Daten gaben Hinweise dafür, daß bei der Buche *Fagus sylvatica* L. infolge UV-B-Exposition eine Regulation auf Transkriptionsebene stattgefunden hat und die drastische Reprimierung der Transkripte verschiedener Gene nur transient war. Da diese Effekte auf Proteinebene wesentlich schwächer waren, deutete das darauf hin, daß sich die Buchensämlinge innerhalb weniger Stunden an die UV-B-Exposition adaptierten.

Auf *in vitro* Translationsebene gab es bei der Buche *Fagus sylvatica* L. 18 mRNAs, die unter Berücksichtigung der UV-B- und Starklicht-Tagesgänge direkt dem UV-B-Effekt zugeordnet werden konnten. Es wurde belegt, daß infolge erhöhter UV-B-Exposition 10 Transkripte neu vorhanden waren und die Transkripte von 8 Proteinen nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Diesen charakteristischen Veränderungen unterlagen überwiegend saure und basische Proteine. Die Effekte waren zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kinetik zu sehen (7 h, 10 h, 18 h, 28 h und 31 h nach Versuchsbeginn).

Die DDRT-PCR wurde eingesetzt, um UV-B-vermittelte Antworten auf Genebene in Buchenblättern zu identifizieren. Bei den isolierten cDNAs wurden geringe Homologien verschiedener Buchenklone in der TIGR-*Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbank gefunden: UV-B-reprimierte Buchenklone zeigten Ähnlichkeiten zur Peroxidase, zur „DNA directed RNA-

Polymerase alpha chain“ und zu einem „ara-3, ras-related GTP-binding protein“. Durch UV-B-Exposition induzierte Buchenklone wiesen Homologien zu dem „ABI-3“, zu dem „phytochrome regulated gene“ und zur Squalen-Synthase auf. Die Sequenzen dieser Buchenklone wurden zum ersten Mal beschrieben.

Erstmals wurde ein ribosomaler Klon L37 bei der Buche beschrieben. Die L37 mRNA wurde aufgrund erhöhter UV-B-Exposition transient induziert. Bei erhöhter Ozon-Behandlung erreichte das Transkript dieses Klons zwei zeitlich voneinander getrennte Maxima; das zweite Maximum (am 3. Tag der Behandlung, 1,6-fache Induktion) ging mit sichtbaren Ozon-Schäden an den jungen Seitentrieben der Buche einher. Die Funktion dieses Proteins ist bisher noch unbekannt. Für eine direkte Zuordnung der isolierten Klone zu den Proteinspots auf der 2D-PAGE müßte eine Sequenzierung der Proteinspots erfolgen. Die Menge der Proteinspots für eine Proteinsequenzierung war jedoch nicht ausreichend.

Über die TIGR-*Arabidopsis thaliana*-EST-Datenbank wurde erstmalig ein nach UV-B-Exposition induzierter Buchenklon isoliert, der hohe Homologien zum „nascent polypeptide associated complex alpha chain“ aufwies. Dieses Transkript wurde bereits nach 3 h UV-B-Exposition transient induziert. Der durch Ozon-Exposition reprimierende Effekt wurde durch die kombinierte UV-B/Ozon-Exposition aufgehoben.

Die UV-B-vermittelte Induktion dieser zwei Buchenklone unterstützten die auf der 2D-PAGE Analyse resultierende Hypothese, daß die Regulation nach UV-B-Exposition vor allem auf Transkriptionsebene stattzufinden scheint.

Die Daten der vorliegenden Arbeit ergaben folgende Schlußfolgerungen:

Das Differentielle Display wurde eingesetzt, um infolge UV-B-Exposition differentielle cDNAs in Buchenblättern zu klonieren. Mittels der durchgeführten Northern-Blots wurde gezeigt, daß die Veränderungen auf Transkriptebeine durch erhöhte UV-B-Exposition bedingt waren. Die vorliegenden Daten belegten, daß 6 verschiedene Transkripte infolge UV-B-Exposition transient induziert wurden. Diese überwiegenden transienten Veränderungen wurden ebenso durch die Untersuchungen mittels 2D-PAGE auf löslicher Gesamtprotein- und Transkriptebeine bestätigt. Das bedeutet, daß innerhalb kurzer Zeit eine Anpassung der Buche an die veränderten Umweltbedingungen erfolgte. Möglicherweise kann dies durch die Anzucht der Buchensämlinge unter UV-B und Schwachlicht begründet werden. Diese Bedingungen sind jedoch umweltrelevant, da die Pflanze in jungen Jahren unter schattigen Lichtbedingungen heranwächst.

In der vorliegenden Arbeit wurden infolge abiotischer Streßbehandlung (erhöhtes UV-B) erstmals 2 eindeutig transient induzierte differentielle Buchenklone isoliert: der ribosomale Klon L37 und der „nascent polypeptide associated complex alpha chain“ Klon. Die durchgeführten Northern-Blot Analysen zeigten, daß sich diese 2 Klone als Kandidaten für

Molekulare Marker zum Nachweis frühzeitiger UV-B-vermittelter Änderungen auf Transkriptebene bei *Fagus sylvatica* L. eignen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- ABTS H.F., BREUHAHN K., MICHEL G., KÖHRER K., ESSER P., RUZICKA T. (1997): Analysis of UV-B-modulated gene expression in human keratinocytes by mRNA differential display polymerase chain reaction. *Photochem. Photobiol.* 66 (3): 363-367.
- AHMAD M., CASHMORE A.R. (1997): The blue-light receptor cryptochrome 1 shows functional dependence on phytochrome A or phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 11 (3): 421-427.
- AHMAD M., JARILLO J.A., KLIMCZAK L.J., LANDRY L.G., PENG T., LAST R.L., CASHMORE A.R. (1997): An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9 (2): 199-207.
- AKTINSON R. (1990): Gas phase tropospheric chemistry of organic compounds: A review. *Atmos. Environ.* 24 A: 1-41.
- ALSCHER R.G., HESS J.L. (1993): Antioxidants in higher plants. In: Alscher R.G., Hess J.L. (eds.) *DRD press*, Boca Raton, FL.
- ANAI T., HASEGAWA K., WATANABE Y., UCHIMIYA H., ISHIZAKI R., MATSUI M. (1991): Isolation and analysis of cDNAs encoding small GTP-binding proteins of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 108 (2): 259-264.
- ANDERSON N.L., ANDERSON N.G. (1998): Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electroph.* 19: 1853-1861.
- BACK K., HE S., KIM K.U., SHIN D.H. (1998): Cloning and bacterial expression of sesquiterpene cyclase, a key branch point for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-challenged leaves of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Physiol.* 39 (9): 899-904.
- BAHL A., KAHL G. (1995): Air pollutant stress changes the steady-state transcript levels of three photosynthesis genes. *Environ. Pollut.* 88: 57-65.
- BAHL A., LOITSCH S., KAHL G. (1993): Air pollution and plant gene expression. In: Gresshoff P. (ed.): *Current topics in plant molecular biology: plant responses to the environment*. CRC press, Boca Raton, FL: 71-96.
- BARNARD G.F., STANIUNAS R.J., PUDER M., STEELE G.D. JR., CHEN L.B. (1994): Human ribosomal protein L37 has motifs predicting serine/threonine phosphorylation and a zinc-finger domain. *Biochim. Biophys. Acta* 1218: 425-428.
- BARNES P.W., FLINT S.D., CALDWELL M.M. (1987): Photosynthesis damage and protective pigments in plants from a latitudinal arctic/alpine gradient exposed to supplemental UV-B radiation in the field. *Arctic Alpine Res.* 19: 21-27.

- BATSCHAUER A., BRUNO E., SCHÄFER E. (1991). Cloning and characterization of a chalcone synthase gene from mustard and its light-dependent expression. *Plant Mol. Biol.* 16: 175-185.
- BAUDIN-BAILLIEU A., TOLLERVEY D., CULLIN C., LACROUTE F. (1997): Functional analysis of Rrp7p, an essential yeast protein involved in pre-rRNA processing and ribosome assembly. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5023-5032.
- BAUER D., MÜLLER H., REICH J., RIEDEL H., AHRENKIEL V., WARTHOF P., STRAUSS M. (1993): Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Research*, Vol 21 (18): 4272-4280.
- BAUMBUSCH L.O., EIBLMEIER M., SCHNITZLER J.-P., HELLER W., SANDERMANN H. JR., POLLE A. (1998): Interactive effects of ozone and low UV-B radiation on antioxidants in spruce (*Picea abies*) and pine (*Pinus sylvestris*) needles. *Physiol. Plant.* 104: 248-254.
- BAVCON J., GABERSCIK A., BATIC F. (1996): Influence of UV-B radiation on photosynthetic activity and chlorophyll fluorescence kinetics in Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] seedlings. *Trees* 10: 172-176.
- BENITO E.P., PRINS T., VAN KAN J.A.L. (1996): Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. *Plant Mol. Biol.* 32: 947-957.
- BERKELAAR E.J., ORMROD D.P., HALE B.A. (1996): The influence of photosynthetically active radiation on the effects of ultraviolet-B radiation on *Arabidopsis thaliana*. *Photochem. Photobiol.* 64 (1): 110-116.
- BI Y.-M., KENTON P., MUHR L., DARBY R., DRAPER J. (1995): Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J.* 8: 235-245
- BLANCHARD R.K., COUSINS R.J. (1996): Differential display of intestinal mRNAs regulated by dietary zinc. *Proc. Natl. Acad. Sci* 93: 6863-6868.
- BLUM H., BEIER H., GROSS H. J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- BONHAM-SMITH P.C., OANCIA T.L., MOLONEY M.M. (1992): Cytoplasmic ribosomal protein S15a from *Brassica napus*: molecular cloning and developmental expression in mitotically active tissues. *Plant Mol. Biol.* 18: 909-919.
- BORNEMANN J.F. (1989): Target sites of UV-B radiation in photosynthesis of higher plants. *J. Photochem. Photobiol.* 4: 145-158.
- BORNEMANN J.F., TERAMURA A.H. (1993): Effects of ultraviolet-B radiation on terrestrial plants. In: Young A. R. et al. (eds.): *Environmental UV photobiology*. Plenum Press New York: 427-473.

- BOWLER C., VAN CAMP W., VAN MONTAGU M., INZE D. (1994): Superoxide dismutase in plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 199-218.
- BRADFORD M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- BRAUN S., FLÜCKINGER W. (1995): Effects of ambient ozone on seedlings of *Fagus sylvaticus* L. and *Picea abies* (L.) Karst. *New Phytol.* 129: 33-44.
- BRITT A.B. (1996): DNA damage and repair in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 75-100.
- BRITT A.B. (1999): Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends Plant Sci.* 4 (1): 20-25.
- BRUNS B., HAHNBROCK K., SCHÄFER E. (1986): Fluence dependence of the ultraviolet-light-induced accumulation of chalcone synthase mRNA and effects of blue and far-red light in cultured parsley cells. *Planta* 169: 393-398.
- CADENAS E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Rev. Biochem.* 58: 79-110.
- CALDWELL M.M. (1971): Solar ultraviolet radiation and the growth and development of higher plants. In: Giese A.C. (ed.): *Photophysiology*. Academic Press, New York. 6: 131-177.
- CALDWELL M.M., ROBBERECHT R., FLINT S.D. (1983): Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiol. Plant.* 58: 445-450.
- CALDWELL M.M., TERAMURA A.H., TEVINI M. (1989): The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. *Trends Ecol. Evol.* 4: 363-367.
- CARPER D.A., SUN J.K., IWATA T., ZIGLER J.S. JR., IBARAKI N., LIN L.R., REDDY V. (1999): Oxidative stress induces differential gene expression in a human lens epithelial cell line. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40 (2): 400-406.
- CASTILLO F.J., HEATH R.L. (1990): Ca^{2+} transport in membrane vesicles from pinto bean leaves and its alteration after ozone exposure. *Plant Physiol.* 94: 788-795.
- CELIS J.E., ØSTERGAARD M., JENSEN N.A., GROMOVA I., RASMUSSEN H.H., GROMOV P. (1998): Human and mouse proteomic databases: novel resources in protein universe. *FEBS L.* 430: 64-72.
- CEN Y. P., BORNEMANN J.F. (1990): The response of bean plants to UV-B radiation under different irradiance of background visible light. *J. Exp. Bot.* 41: 1489-1495.
- CEN Y. P., BORNEMANN J.F. (1993): The effect of exposure to enhanced UV-B radiation on the penetration of monochromatic and polychromatic UV-B radiation in leaves of *Brassica napus*. *Physiol. Plant.* 87: 249-255.

- CHAMEIDES W.L., KASIBHATA P.S., YIENGER J., LEVY H. (1994): Growth of continental-scale metro-agro-plexes, regional ozone pollution, and world food production. *Sci.* 264: 74-77.
- CHANDRASHEKHAR P.J., NGUYEN H.T. (1996): Differential display-mediated rapid identification of different members of a multigene family, HSP16.9 in wheat". *Plant Mol. Biol.* 31: 575-584.
- CHANG S., PURYEAR J., CHAIRNEY J. (1993): A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11 (2): 113-116.
- CHEN G.-X., ASADA K. (1989): Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol.* 30: 987-998.
- CHEN J.J., MITCHELL D.L., BRITT A.B. (1994): A light-dependent pathway for the elimination of UV-induced pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 6: 1311-1317.
- CHEN Z., SILVA H., KLESSIG D.F. (1993): Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Sci.* 262: 1883-1886.
- CHRISTIE J.M., JENKINS G.I. (1996): Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* 8: 1555-1567.
- CICERONE R.J. (1987): Changes in stratospheric ozone. *Sci.* 237: 35-42.
- CONKLIN P.L., LAST R.L. (1995): Differential accumulation of antioxidant mRNAs in *Arabidopsis thaliana* exposed to ozone. *Plant Physiol.* 109: 203-212.
- CORBETT J.M., DUNN M.J., POSCH A., GÖRG A. (1994): Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electroph.* 15: 1205-1211.
- CONVERSO D.A., FERNÁNDEZ M.E. (1995): Peroxidase isozymes from wheat germ: purification and properties. *Phytochem.* 40 (5): 1341-1345.
- CREISSEN G.P., EDWARDS E.A., MULLINEAUX P.M. (1994): Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. In: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (eds.): Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC press, Boca Raton, FL: 343-364.
- DAI Z., GAO J., AN K., LEE J.M., EDWARDS G.E., AN G. (1996): Promotor elements controlling developmental and environmental regulation of a tobacco ribosomal protein gene L34. *Plant Mol. Biol.* 32: 1055-1065.

- DALLERY E., QUIEF S., BEN JILANY K.E., KERCKAERT J.P., HAGEGE D. (1996): Molecular cloning and structural analysis of cDNAs that encode 3 small GTP-binding proteins from sugar beet. C.R. Acad. Sci. III 319: 91-97.
- DAVIES W.J., JONES H.G. (1991): Absciscic acid physiology and biochemistry. Oxford, Bios Scientific Publishers.
- DAY T. A., MARTIN G., VOGELMANN T. C. (1993): Penetration of UV-B radiation in foliage: evidence that the epidermis behaves as a non-uniform filter. Plant Cell Environ. 16: 735-741.
- DAY T.A., VOGELMANN T.C., DELUCIA E.H. (1992): Are some plant life forms more effective than others in screening out ultraviolet-B radiation? Oecologia 92: 513-519.
- DECKMYN G., MARTENS C., IMPENS I. (1994): The importance of the ratio UV-B/photosynthetic active radiation (PAR) during leaf development as determining factor of plant sensitivity to increased UV-B irradiance: effects on growth, gas exchange and pigmentation of bean plants (*Phaseolus vulgaris* cv. Label). Plant Cell Environ. 17: 295-301.
- DIDIERJEAN L., FRENDON P., NASSER W., GENOT G., MARIVET J., BURKHARD G. (1996): Heavy-metal-responsive genes in maize: identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress. Planta 199: 1-8.
- DÖHRING T., KÖFFERLEIN M., THIEL S., SEIDLITZ H. K. (1996): Spectral shaping of artificial UV-B irradiation for vegetation stress research. J. Plant Physiol. 148: 115-119.
- DOKE N., MIURA Y., SANCHEZ L., KAWAKITA K. (1994): Involvement of superoxide in signal transduction; responses to attack by pathogens, physical and chemical shocks and UV irradiation. In: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (eds.): Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC press, Boca Raton, FL. (ISBN: 0-8493-5443-9): 177-198.
- ECKEY-KALTENBACH H., ERNST D., HELLER W., SANDERMANN H. JR. (1994a): Biochemical plant responses to ozone. IV. Cross-induction of defensive pathways in parsley (*Petroselinum crispum* L.) plants. Plant Physiol. 104: 67-74.
- ECKEY-KALTENBACH H., GROßKOPF E., SANDERMANN H. JR., ERNST D. (1994b): Induction of pathogen defence genes in parsley (*Petroselinum crispum* L.) plants by ozone. Proc. Royal Soc. Edinburgh 102B: 63-74.
- ECKEY-KALTENBACH H., KIEFER E., GROSSKOPF E., ERNST D., SANDERMANN H. JR. (1997): Differential transcript induction of parsley pathogenesis-related proteins and of a small heat shock protein by ozone and heat shock. Plant Mol. Biol. 33: 343-350.
- EDWARDS E.A., ENARD C., CREISSEN G.P., MULLINEAUX P.M. (1994): Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. Planta 192: 137-143.

- ELSTNER E.F. (1988): Schadstoffe, die über die Luft zugeführt werden. In: Hock B., Elstner E.F. (eds.): *Schadwirkungen auf Pflanzen. Lehrbuch der Pflanzentoxikologie*. 2. Aufl., BI Wissenschaftsverlag, Mannheim: 67-95.
- ERNST D., BODEMANN A., SCHMELZER E., LANGEBARTELS C., SANDERMANN H. JR. (1996): β -1,3-glucanase mRNA is locally, but not systematically induced in *Nicotiana tabacum* L. cv. BEL W3 ozone fumigation. *J. Plant Physiol.* 148: 215-221.
- ERNST D., SCHRAUDNER M., LANGEBARTELS C., SANDERMANN H. JR. (1992): Ozone-induced changes of mRNA levels of β -1,3-glucanase, chitinase and pathogenesis-related protein 1b in tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 20: 673-682.
- ESCHELBACH A., HUNZIKER A., KLIMASCHEWSKI L. (1998): Differential display PCR reveals induction of immediate early genes by vasoactive intestinal peptide in PC12 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 865: 181-188.
- FARHAM J.C., GARDINER B.G., SHANKLIN J.D. (1985): Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal $\text{C}_{10}\text{x}/\text{NO}_\text{x}$ interaction. *Nature* 315: 207-210.
- FEDER W.A., SHRIER R. (1990): Combination of UV-B and ozone reduces pollen tube growth more than either stress alone. *Environ. Exp. Bot.* 30: 451-454.
- FEINBERG A.P., VOGELSTEIN B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- FELDBRÜGGE M., SPRENGER M., DINKELBACH M., YAZAKI K., HARTER K., WEISSHAAR B. (1994): Functional analysis of a light-responsive plant bZIP transcriptional regulator. *Plant Cell* 6: 1607-1621.
- FLINT S.D., CALDWELL M.M. (1984): Partial inhibition of in vitro pollen germination by simulated solar ultraviolet-B radiation. *Ecology* 65: 792-795.
- FOYER C.H., LELANDIS M., KUNERT K.J. (1994): Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92: 696-717.
- FREDERICKSEN T.S., KOLB T.E., SKELLY J.M., STEINER K.C., JOYCE B.J., SAVAGE J.E. (1996): Light environment alters ozone uptake per net photosynthetic rate in black cherry trees. *Tree Physiol.* 16: 485-490.
- FROHMAN M.A., DUSH M.K., MARTIN G.R. (1988): Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 8998-9002.
- FROHNMEYER H., BOWLER C., SCHÄFER E. (1997): Evidence for some signal transduction elements involved in UV-light-dependent responses in parsley protoplasts. *J. Exp. Bot.* 48 (308): 739-750.
- FROHNMEYER H., EHRLMANN B., KRETSCH T., ROCHOLL M., HARTER K., NAGATANI A., FURUYA M., BATSCHAUER A., HAHNBROCK K., SCHÄFER E. (1992): Differential usage of

- photoreceptors for chalcone synthase gene expression during plant development. *The Plant J.* 2: 899-906.
- FUGLEVAND G., JACKSON J.A., JENKINS G.I. (1996): UV-B, UV-A, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in arabidopsis. *Plant Cell* 8 (12): 2347-2357.
- GALLIANO H., CABANÉ M., ECKERSKORN C., LOTSPEICH F., SANDERMANN JR. H., ERNST D. (1993): Molecular cloning, sequence analysis and elicitor-/ozone-induced accumulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase from Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Mol. Biol.* 23: 145-156.
- GANTT J.S., KEY J.L. (1985): Coordinated expression of ribosomal proteins in RNAs following auxin treatment of soybean hypocotyles. *J. Biol. Chem.* 260: 6175-6181.
- GAO J., KIM S.-R., CHUNG Y.-Y., LEE J.M., AN G. (1994): Developmental and environmental regulation of two ribosomal protein genes in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 25: 761-770.
- GARCIA-FERRIS C., MORENO J. (1994): Oxidative modification and breakdown of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase induced in *Euglena gracilis* by nitrogen starvation. *Planta* 193: 208-215.
- GIRAUDAT J., HAUGE B.M., VALON C., SMALLE J., PARCY F., GOODMAN H.M. (1992): Isolation of the *Arabidopsis* ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4 (10): 1251-1261.
- GÖRG A., POSTEL W., DOMSCHEIT A., GÜNTHER S. (1988a): Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients of leaf proteins from barley (*Hordeum vulgare*): method, reproducibility and genetic aspects. *Electroph.* 9: 681-692.
- GÖRG A., POSTEL W., GÜNTHER S. (1988b): Two-dimensional electrophoresis. *Electroph.* 9: 531-546.
- GÖRG A., BOGUTH G., OBERMAIER C., POSCH A., WEISS W. (1995): Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electroph.* 16: 1079-1086.
- GONZÁLEZ R., MEPSTED R., WELLBURN A.R., PAUL N.D. (1998): Non-photosynthetic mechanisms of growth reduction in pea (*Pisum sativum* L.) exposed to UV-B radiation. *Plant Cell Environ.* 21: 23-32.
- GREEN R., FLUHR R. (1995): UV-B induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. *Plant Cell* 7: 203-212.
- GROßKOPF E., WEGENER-STRAKE A., SANDERMANN H. JR., ERNST D. (1994): Ozone-induced metabolic changes in Scots pine: mRNA isolation and analysis of in vitro translated proteins. *Can. J. For. Res.* 24: 2030-2033.

- GUDERIAN R., KLUMPP A., KLUMPP G. (1990): Reaktionen von Baumarten auf Luftschadstoffe unter kontrollierten Bedingungen. In: Ulrich B. (ed.): International congress on forest decline research: State of knowledge and perspectives. Lectures Vol. Friedrichshafen: 445-478.
- GUDERIAN R., TINGEY D.T., RABE R. (1985): Effects of photochemical oxidants on plants. In: Guderian R. (ed.): Air pollution by photochemical oxidants. Formation, transport, control and effects on plants. Springer-Verlag, Berlin: 129-333.
- GUIMARÃES M.J., LEE F., ZLOTNIK A., MCCLANAHAN T. (1995): Differential display by PCR: novel findings and applications. Nucl. Acids Res. 23 (10): 1832-1833.
- GUPTA A.S., ALSCHER R.G., MCCUNE D. (1991): Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. Plant Physiol. 96: 650-655.
- GURLEY W.B., KEY J.L. (1991): Transcriptional regulation of the heat-shock response: a plant perspective. Biochem. 30: 1-12.
- GUZY M.R., HEATH R.L. (1993): Response to ozone in common bean varieties. New Phytol. 124: 617-625.
- HAHLBROCK K., SCHEEL D. (1989): Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 347-369.
- HALLIWELL B. (1987): Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. Chem. Phys. Lipids 44: 327-340.
- HARTMANN U., VALENTINE W.J., CHRISTIE J.M., HAYS J., JENKINS G.I., WEISSHAAR B. (1998): Identification of UV/blue light-response elements in the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase promoter using homologous protoplast transient expression system. Plant Mol. Biol. 36: 741-754.
- HE. J., HUANG L.K., WHITECROSS M.I. (1994): Chloroplast ultrastructure changes in *Pisum sativum* associated with supplementary ultraviolet (UV-B) radiation. Plant Cell Environ. 17: 771-775.
- HEATH R.L. (1987): The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells. Rec. Adv. Phytochem. 21: 29-54.
- HEATH R.L. (1988): Biochemical mechanisms of pollutant stress. In: Heck W.W., Taylor O.C. and Tingey D.T. (eds.): Assessment of crop loss from air pollutants, Elsevier applied, New York: 259-268.
- HEATH R.L. (1994): Possible mechanisms for the inhibition of the photosynthesis by ozone. Photosynth. Res. 39: 439-451.
- HEATH R.L., CASTILLO F.J. (1988): Membrane disturbances in response to air pollutants. In: Schulte-Hosted S., Blank L., Darrall N. and Wellburn A.R. (eds.): Air pollution and plant metabolism, de Gruyter, Berlin: 55-75.

- HEATH R.L., TAYLOR G.E. (1997): Physiological processes and plant responses to ozone exposure. In: Sandermann Jr.H., Wellburn A.S., Heath R.L. (eds.): Forest decline and ozone: a comparison of controlled chamber and field experiments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 127: 317-368.
- HEMLEBEN V., GANAL M., GERSTNER J., SCHIEBEL K., TORRES R.A. (1988): Organization and length heterogeneity of plant ribosomal RNA genes. In: Kahl G. (ed.): Architecture of eukaryotic genes. Verlag Chemie, Weinheim: 371-383.
- HILGERS K.F., PENTZ E.S., GOMEZ R.A. (1998): Angiotensin-dependent gene expression in developing rat kidney. *Kidney Int. Suppl.* 67: 146-148.
- HORWATH C.J. (1991): Molecular responses of plants to an increased incidence of heat shock. *Plant Cell Environ.* 14: 831-841.
- HURKMAN W.J., TANAKA C.K. (1988): Polypeptide changes induced by salt stress, water deficit, and osmotic stress in barley roots: a comparison using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 9: 781-787.
- IKONOMOV O.C., JACOB M.H. (1996): Differential display protocol with selected primers that preferentially isolates mRNAs of moderate – to low – abundance in a microscopic system.
- IWANZIK W., TEVINI M., DOHNT G., VOSS M., WEISS W., GRÄBER O., RENGIER G. (1983): Action of UV-B radiation on photosynthetic primary reactions in spinach chloroplasts. *Physiol. Plant.* 58: 401-407.
- JANSEN M.A.K., GREENBERG B.M., EDELMANN M., MATTOO A.K., GABA V. (1996): Accelerated degradation of the D2 protein of photosystem II under ultraviolet radiation. *Photochem. Photobiol.* 63 (6): 814-817.
- JANSEN M.A.K., GABA V., GREENBERG B.M. (1998): Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci.* 3 (4): 131-136.
- JENKINS G.I. (1997): UV and blue light signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 20: 773-778.
- JENKINS G.I. (1998): UV and blue light signal transduction in the regulation of flavanoid biosynthesis gene expression in *Arabidopsis*. In: Lo Schiavo F., Last R.L., Morelli G., Raikhel N.V. (eds.): Cellular integration of signalling pathways in plant development. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg: Vol. 104.
- JENKINS G.I., CHRISTIE J.M., FUGLEVAND G., LONG J.C., JACKSON J.A. (1995): Plant responses to UV and blue light: biochemical and genetic approaches. *Plant Sci.* 112: 117-138.
- JIANG N., TAYLOR J.-S. (1993): In vivo evidence that UV-induced C→T mutations at pyrimidine sites could result from the replicative bypass of *cis-syn* cyclobutane dimers of their deamination products. *Biochem.* 32: 472-481.

- JOANIN P., GIGOT C. PHILLIPS G. (1993): cDNA nucleotide sequence and expression of a maize cytoplasmic ribosomal protein S13 gene. *Plant Mol. Biol.* 21: 701-704.
- JORDAN B.R. (1993): The molecular biology of plants exposed to ultraviolet-B radiation and the interaction with other stresses. In: Jackson M.B., Black C.R. (eds.): *Interacting stresses on plants in a changing climate*. Springer-Verlag, Heidelberg: 153-170.
- JORDAN B.R. (1996): The effects of ultraviolet-B radiation on plants: a molecular perspective. In: *Advances in Botanical Research* 22: 97-162.
- JORDAN B.R., CHOW W.S., STRID Å., ANDERSON J.M. (1991): Reduction in *cab* and *psb A* RNA transcripts in response to supplementary ultraviolet-B radiation. *FEBS Lett.* 284: 5-8
- JORDAN B.R., HE J., CHOW W.S., ANDERSON J.M. (1992): Changes in mRNA levels and polypeptide subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in response to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Cell Environ.* 15: 91-98.
- JORDAN B.R., JAMES P., STRID Å. ANTHONY R. (1994): The effect of ultraviolet-B radiation on gene expression and pigment composition in etiolated and green pea leaf tissue: UV-B induced changes are gene-specific and dependent upon the developmental stage. *Plant Cell Environ.* 17: 45-54.
- JORDAN B.R., JAMES P.E., MACKERNESS S.A.-H. (1998): Factors affecting UV-B-induced changes in *Arabidopsis thaliana* L. gene expression: the role of development, protective pigments and the chloroplast signal. *Plant Cell Physiol.* 39 (7): 769-778.
- JOSHI C.P. (1987): Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. *Nucl. Acids Res.* 15 (23): 9627-9640.
- JOSHI C.P., NGUYEN H.T. (1996): Differential display-mediated rapid identification of different members of a multigene family, HSP 16.9 in wheat. *Plant Mol. Biol.* 31: 575-584.
- KAISER T., EMMER K., KRETSCH T., WEISSHAAR B., SCHÄFER E., BATSCHAUER A. (1995): Promotor elements of the mustard *CHS1* gene are sufficient for light-regulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 28: 219-229.
- KALBIN G., OHLSSON A.B., BERGLUND T., RYDSTROM J., STRID Å. (1997): Ultraviolet-B-radiation-induced changes in nicotinamide and glutathione metabolism and gene expression in plants. *Eur. J. Biochem.* 249 (2): 465-472.
- KANGASJÄRVI J., TALVINEN J., UTRIAINEN M., KARJALAINEN R. (1994): Plant defence systems induced by ozone. *Plant Cell Environ.* 17: 783-794.
- KARGIOLAKI H., OSBORNE D.J., THOMPSON F.B. (1991): Leaf abscission and stem lesions (intumescences) on poplar clones after SO₂ and O₃ fumigation: a link with ethylene release? *J. Exp. Bot.* 42: 1189-1198.

- KÄRENLAMPI S.O., AIRAKSINEN K., MIETTINEN A.T.E., KOKKO H.I., HOLOPAINEN J.K., KÄRENLAMPI L.V., KARJALAINEN R.O. (1994): Pathogenesis-related proteins in ozone-exposed Norway spruce [*Picea abies* (Karst) L.]. *New Phytol.* 126: 81-89.
- KENDRICK R.E., KERCKHOFFS L.H.J., VAN TUINEN A., KOORNNEEF M. (1997): Photomorphogenic tomato mutants. *Plant Cell Environ.* 20: 746-751.
- KERSTIENS G., LENDZIAN K.J. (1989): Interactions between ozone and plant cuticles. I. Ozone deposition and permeability. *New Phytol.* 112: 13-19.
- KIISKINEN M., KORHONEN M., KANGASJÄRVI J. (1997): Isolation and characterization of cDNA for plant mitochondrial phosphate translocator (*Mpt 1*): ozone stress induces *Mpt 1* mRNA accumulation in birch (*Betula pendula* Roth). *Plant Mol. Biol.* 35: 271-279.
- KIM B.C., TENNESSEN D.J., LAST R.L. (1998): UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 15 (5): 667-674.
- KLESSIG D.F., MALAMY J. (1994): The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* 72: 427-441.
- KLEY D., GEISS H., HEIL T., HOLZAPFEL C. (1990): Ozon in Deutschland. Die Belastung durch Ozon in ländlichen Gebieten im Kontext der neuartigen Waldschäden. Monographien des Forschungszentrums Jülich, Bd. 2, Zentralbibliothek Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich.
- KOORNNEEF M., HANHART C.J., HILHORST H.W.M., KARSSSEN C.M. (1989): *In vivo* inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 90: 463-469.
- KOORNNEEF M., REULING G., KARSSSEN C.M. (1984): The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant* 61: 377-383.
- KOOTSTRA A. (1994): Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol. Biol.* 26: 771-774.
- KORNBERG A., BAKER T.A. (1992): DNA replication. Freeman W.H. (ed.) New York: 771-791.
- KRAMER G.F., KRIZEK D.T., MIRECKI R.M. (1992): Influence of photosynthetically active radiation and spectral quality on UV-B induced polyamine accumulation in soybean. *Phytochem.* 31: 1119-1125.
- KRAMER G.F., NORMAN H.A., KRIZEK D.T., MIRECKI R.M. (1991): Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochem.* 30: 2101-2108.

- KRUPA S.V., KICKERT R.N. (1989): The greenhouse effect: impacts of ultraviolet-B (UV-B) radiation, carbon dioxide (CO₂) and ozone (O₃) on vegetation. *Environ. Pollut.* 61: 263-393.
- KUBO A., SAJI H., TANAKA K., KONDO N. (1995): Expression of *Arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. *Plant Mol. Biol.* 29: 479-489.
- KUHLEMEIER C., GREEN P.J., CHUA N.-H. (1987): Regulation of gene expression in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 221-257.
- KUNKEL T., NEUHAUS G., BATSCHAUER A., CHUA N.-H., SCHÄFER E. (1996): Functional analysis of yeast derived phytochrome A and B-phytylcyanobilin adducts. *Plant J.* 10: 625-636.
- LANDRY L.G., STAPLETON A.E., LIM J., HOFFMANN P., HAYS J.B., WALBOT V., LAST R.L. (1997): An *Arabidopsis* photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (1): 328-332.
- LANGEBARTELS C., ERNST D., HELLER W., LÜTZ C., PAYER H.-D., SANDERMANN H. JR. (1997): Ozone responses of trees: results from controlled chamber exposures at the GSF phytotron. In: Sandermann H., Wellburn A.R., Hetah R.L. (eds.): *Forest decline and ozone – a comparison of controlled chamber and field experiments*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1997): *Ecolog. Studies* 127: 163-200.
- LANGEBARTELS C., HELLER W., KERNER K., LEONARDI S., ROSEMAN D., SCHRAUDNER M., TROST M., SANDERMANN H. (1990): Ozone-induced defense reactions in plants. In: Payer H.-D., Pfirrmann T., Mathy P. (eds.): *Environmental research with plants in closed chambers*. Air pollution research reports. Vol. 26. CEC, Brussels: 358-368.
- LANGEBARTELS C., KERNER K., LEONARDI S., SCHRAUDNER M., TROST M., HELLER W., SANDERMANN H. JR. (1991): Biochemical plant responses to ozone. I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 95: 882-889.
- LAVOLA A. (1998): Accumulation of flavanoids and related compounds in birch induced by UV-B irradiance. *Tree Physiol.* 18: 53-58.
- LEARNED R.M. (1996): Light suppresses 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 645-655.
- LI Y.F., SANCAR A. (1990): Active site of *Escherichia coli* DNA photolyase: mutations at Trp277 alter the selectivity of the enzyme without affecting the quantum yield of photorepair. *Biochem.* 29: 5698-5706.
- LIANG P., AVERBOUKH L., PARDEE B. (1993): Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucl. Acids Res.* 21 (14): 3269-3275.

- LIANG P., PARDEE A.B. (1992): Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Sci.* 257: 967-971.
- LIJSEBETTENS M.V., VANDERHAEGHEN R., BLOCK M.D., BAUW G., VILLARROEL R., MONTAGU M.V. (1994): An S18 ribosomal protein gene copy at the *Arabidopsis PFL* locus affects plant development by its specific expression in meristems. *EMBO J.* 13: 3378-3388.
- LIN C., ROBERTSON D.E., AHMAD M., RAIBEKAS R.A., JORNS S., DUTTON L., CASHMORE A.R. (1995): Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1. *Sci.* 269: 968-970.
- LINDQUIST S., CRAIG E.A. (1988): The heat shock proteins. *Ann. Rev. Gen.* 22: 631-677.
- LIU L., MCCLURE J.W. (1995): Effects of UV-B on activities of enzymes of secondary phenolic metabolism in barley primary leaves. *Physiol. Plant.* 93: 734-739.
- LIVESEY F.J., HUNT S.P. (1998): Differential display cloning of genes induced in regenerating neurons. *Methods* 16 (4): 386-395.
- LOGEMANN E., WU S.-C., SCHRÖDER J., SCHMELZER E., SOMSSICH I.E., HAHNBROCK K. (1995): Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-regulated genes. *The Plant J.* 8 (6): 865-876.
- LONG J.C., JENKINS G.I. (1998): Involvement of plasma membrane redox activity and calcium homeostasis in the UV-B and UV-A/Blue light induction of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10 (12): 2077-2086.
- LUWE M. (1996): Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves: seasonal variations and responses to changing ozone concentrations in air. *Plant Cell Environ.* 19: 321-328.
- MACKERNESS S.A.-H., THOMAS B., JORDAN B.R. (1997): The effect of supplementary ultra-violet-B radiation on mRNA transcripts, translation and stability of chloroplast proteins and pigment formation in *Pisum sativum* L.. *J. Experim. Bot.* 48 (308): 729-738.
- MALHOTRA K., KIM S.-T., BATSCHAUER A., DAWUT L., SANCAR A. (1995): Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochem.* 34: 6892-6899.
- MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROCK J. (1982): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- MASAKI H., OKANO Y., SAKURAI H. (1998): Differential role of catalase and glutathione peroxidase in cultured human fibroblasts under exposure of H₂O₂ or ultraviolet B light. *Arch. Dermatol. Res.* 290 (3): 113-118.

- MASON M.E., DAVIS J.M. (1997): Defense response in slash pine: chitosan treatment alters the abundance of specific mRNAs. *Molec. Plant-Microbe Interactions* 10 (1): 135-137).
- MATE Z., SASS L., SZEKERES M., VASS I., NAGY F. (1998): UV-B-induced differential transcription of psbA genes encoding the D1 protein of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *J. Biol. Chem.* 273 (28): 17439-17444.
- MATTHEI H.A. (1989): Auswertung langfristiger Bucheckernlagerversuche in der Forstsaatgut Beratungsstelle im staatlichen Forstamt Oerrel-Niedersachsen. Diplomarbeit, Fachbereich Forstwirtschaft in Göttingen.
- MAYTIN E.V. (1992): Differential effects of heat shock and UVB light upon stress protein expression in epidermal keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 267: 23189-23196.
- MCCARTY D.R., HATTORI T., CARSON C.B., VASIL V., LAZAR M., VASIL I.K. (1991): The *Viviparous-1* developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* 66: 895-905.
- MEHLEN P.J., BRIOLAY L., SMITH C., DIAZ-LATOUD C., FABRE N., PAULI D., ARRIGO A.-P. (1993): Analysis of the resistance to heat and hydrogen peroxide stress in COS cells transiently expressing wild type or deletion mutants of the *Drosophila* 27-kDa heat shock protein. *Eur. J. Biochem.* 215: 277-284.
- MEINS F., NEUHAUS J.M., SPHERISEN C., RYALS J. (1992): The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes. In: Boller T., Meins F. (eds.): *Genes involved in plant defense*. Springer-Verlag Wien New York: 245-282.
- METZ N. (1995): Ozon – ein vielschichtiges Problem. BMW AG (ed.), Abteilung Energie und Umwelt, München.
- MIRECKI R.M., TERAMURA A.H. (1984): Effects of ultraviolet-B on soybean: the dependence of plant sensitivity on the photosynthetic photon flux density during and after leaf expansion. *Plant Physiol.* 74: 475-480.
- MOREAU A., YOTOV W.V., GLORIEUX F.H., ST.-ARNAUD R. (1998): Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Mol. Cell Biol.* 18 (3): 1312-1321.
- NASH J., WALBOT V. (1992): Bronze-2-gene expression and intron splicing patterns in cells and tissues of *Zea mays* L.. *Plant Physiol.* 100: 464-471.
- NEDUNCHEZHIAN N., ANNAMALAINATHAN K., KULANDAIVELU G. (1992). Induction of heat shock-like proteins in *Vigna sinensis* seedlings growing under ultraviolet-B (280-320 nm) enhanced radiation. *Physiol. Plant.* 85: 503-506.
- NEUENSCHWANDER U., VERNOOIJ B., FRIEDRICH L., UKNES S., KESSMAN H., RYALS J. (1995): Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J.* 8: 227-233.

- NEUHAUS G., BOWLER C., HIRATSUKA K., YAMAGATA H., CHUA N.H. (1997): Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *EMBO J.* 16: 2554-2564.
- NEUMANN D., NOVER L., PARTHIER B., RIEGER R., SCHARF K.-D. (1989): Heat shock and other stress response systems of plants. *Biologisches Zentralblatt* 108: 1-156.
- NEWMANN T., DE BRUIJN F.J., GREEN P., KEEGSTRA K., KENDE H., MCINTOSH L., OHLROGGE J., RAIKHEL N., SOMERVILLE S., THOMASHOW M., RETZEL E., SOMERVILLE C. (1994): Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* 106: 1241-1255.
- NIE G.-Y., TOMASEVIC M., BAKER N.R. (1993): Effects of ozone on the photosynthetic apparatus and leaf proteins during leaf development in wheat. *Plant Cell Environ.* 16: 643-651.
- NISHIZAKI Y. (1994): Vanadate and diclohexylcarbodiimide inhibit the blue light-induced depolarisation of the membrane in pulvinar motor cells of *Phaseolus*. *Plant Cell Physiol.* 35: 841-844.
- NOGUÉS S., ALLEN D.J., MORISON J.I.L., BAKER N.R. (1998): Ultraviolet-B radiation effects on water relations, leaf development, and photosynthesis in droughted pea plants. *Plant Physiol.* 117 (1): 173-181.
- NORDQVIST K., TOHONEN V. (1997): An mRNA differential display strategy for cloning genes expressed during mouse gonad development. *Int. J. Dev. Biol.* 41 (4): 627-638.
- NOZAKI J., TAKEHANA M., KOBAYASHI S. (1997): UVB irradiation induces changes in cellular localization and phosphorylation of mouse HSP27. *Photochem. Photobiol.* 65 (5): 843-848.
- O'FARRELL P.H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chemistry* 250 (10): 4007-4021.
- OH B.-J., BALINT D.E., GIOVANNONI J.J. (1995): A modified procedure for PCR-based differential display and demonstration of use in plants for isolation of genes related to fruit ripening. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13 (1): 70-81.
- OHL S., HAHNBROCK K., SCHÄFER E. (1989): A stable blue-light-derived signal modulates ultraviolet-light-induced activation of the chalcone synthase gene in cultured parsley cells. *Planta* 177: 228-236.
- ORMROD D.P., LANDRY L.G., CONKLIN P.L. (1995): Short-term UV-B radiation and ozone exposure effects on aromatic secondary metabolite accumulation and shoot growth of flavonoid-deficient *Arabidopsis* mutants. *Physiol. Plant.* 93: 602-610.
- PANG Q., HAYS J.B. (1991): UV-B inducible and temperature-sensitive photoreactivation of cyclobutane pyrimidine dimers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 536-543.

- PARCY F., GIRAUDAT J. (1997): Interactions between the ABI1 and the ectopically expressed ABI3 genes in controlling abscisic acid responses in *Arabidopsis* vegetative tissues. *Plant J.* 11: 693-702.
- PLANTA R.J., RAUE H.A. (1988): Control of ribosome biogenesis in yeast. *Trends Genet.* 4: 64-68.
- PITCHER L.H., ZILINSKAS B.A. (1996): Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. *Plant Physiol.* 110: 583-588.
- POLLE A. (1997): Defense against photooxidative damage in plants. In: Scandalios J. (ed.): *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. (ISBN: 0-87969-502-1): 623-666.
- POPPE D. (1993): Photochemische Ozonbildung in der Troposphäre. In: Arbeitsgemeinschaft der Großforschungseinrichtungen (AGF) (ed.): *Atmosphärisches Ozon: Prozesse und Wirkungen*. Thenée Bonn: 5-6.
- PORTA A., COLONNA-ROMANO S., CALLEBAUT I., FRANCO A., MARZULLO I., KOBAYASHI G.S., MARESCA B. (1999): An homologue of the human 100-kDa protein (p 100) is differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during infection of murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254 (3): 605-613.
- QUAIL P.H., BOYLAN M.T., PARKS B.M., SHORT T.W., XU Y., WAGNER D. (1995): Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Sci.* 268: 675-680.
- RAMAGLI L.S., RODRIGUEZ L.V. (1985): Quantification of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* 6: 559-563.
- RAMAGOPAL S. (1989): Barley proteins associated with tissue dedifferentiation. *J. Plant Physiol.* 134: 395-405.
- RAMASWAMY N.T., RONAI Z., PELLING J.C. (1998): Rapid activation of JNK1 in UV-B induced irradiated epidermal keratinocytes. *Oncogene* 16 (11): 1501-1505.
- RAO M.V., PALIYATH G., ORMROD D.P. (1995): Differential response of photosynthetic pigments, Rubisco activity and Rubisco protein of *Arabidopsis thaliana* exposed to UVB and ozone. *Photochem. Photobiol.* 62 (4): 727-735.
- RAO M.V., PALIYATH G., ORMROD D.P. (1996): Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 125-136.
- REDDY G.N., ARTECA R.N., DAI Y.-R., FLORES H.E., NEGM F.B., PELL E.J. (1993): Changes in ethylene and polyamines in relation to mRNA levels of the large and small subunits of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in ozone-stressed potato foliage. *Plant Cell Environ.* 16: 819-826.

- REICH P.B. (1987): Quantifying plant response to ozone: a unifying theory. *Tree Physiol.* 3: 63-91.
- REVENKOVA E., MASSON J., KONCZ C., AFSAR K., JAKOVLEVA L., PASKOWSKI J. (1999): Involvement of *Arabidopsis thaliana* ribosomal protein S27 in mRNA degradation triggered by genotoxic stress. *EMBO J.* 18 (2): 490-499.
- RIEHL KOCH J., SCHERZER A.J., ESHITA S.M., DAVIS K.R. (1998): Ozone sensitivity in hybrid poplar is correlated with the lack of defense-gene activation. *Plant Physiol.* 118 (4): 1243-1252.
- ROBICHAUD C.S.; WONG J., SUSSEX I.M. (1980): Control of *in vivo* growth of viviparous embryo mutants of maize by abscisic acid. *Dev. Genet.* 1: 325-330.
- ROCHOLL M., TALKE-MESSERER C., KAISER T., BATSCHAUER A. (1994): Unit 1 of the mustard chalcone synthase promotor is sufficient to mediate light responses from different photoreceptors. *Plant Sci.* 97: 189-198.
- ROSEMAN D., HELLER W., SANDERMANN H. JR. (1991): Biochemical plant responses to ozone. II. Induction of stilbene biosynthesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 97: 1280-1286.
- ROTHNIE H.M. (1996): Plant mRNA 3'-end formation. *Plant Mol. Biol.* 32: 43-61.
- ROUX S.J. (1994): Signal transduction in phytochrome responses. In: Kendrick R.E., Kronenberg G.H.M. (eds.): *Photomorphogenesis in plants*. 2nd edn., Kluwer Academic, Netherlands: 187-209.
- SANCAR A. (1994): Structure and function of DNA photolyase. *Biochem.* 33: 2-9.
- SANCAR A. (1996): No end of history for photolyases. *Science* 272: 48-49.
- SANDERMANN H. (1996): Ozone and plant health. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 347-366.
- SANDERMANN H. JR., LANGEBARTELS C., HELLER W. (1990): Ozonstreß bei Pflanzen. Frühe und „Memory“-Effekte von Ozon auf Nadelbäumen. *Z. Umweltchem. Ökotox* 2: 14-15.
- SANDERMANN H., HELLER W., LANGEBARTELS C. (1989a): Early biochemical effects of air pollutants: detection and possible significance for forest trees. In: Ulrich B. (ed.): *Proc of the int congr on forest decline research: state of knowledge and perspectives*. Friedrichshafen, Kernforschungszentrum Karlsruhe: 517-525.
- SANDERMANN H., SCHMITT R., HELLER W., ROSEMAN D., LANGEBARTELS C. (1989b): Ozone-induced early biochemical reactions in conifers. In: Longhurst J.W.S. (ed.): *Acid deposition. Sources, effects and controls*. British Library, London: 243-254.

- SANDERMANN H., WELLBURN A.R., HEATH R.L. (1997): Forest decline and ozone: a comparison of controlled chamber and field experiments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. Vol. 127.
- SANDERMANN JR. H., ERNST D., HELLER W., LANGEBARTELS C. (1998): Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. Trends Plant Sci. 3 (2): 47-50.
- SANGER F., MICKLEN S., COULSON A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.
- SANGWAN V., LENVIK T.R., GANTT J.S. (1993): The *Arabidopsis thaliana* ribosomal protein S15 (rig) gene. Biochem. Biophys. Acta 1216: 211-226.
- SANTONI V., ROUQUIÉ D., DOUMAS, P., MANSION M., BOUTRY M., DEGAND H., DUPREE P., PACKMAN L., SHERRIER J., PRIME T., BAUW G., POSADA E., ROUZÉ P., DEHAIS P., SAHNOUN I., BARLIER I., ROSSIGNOL M. (1998): Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. Plant J. 16 (5): 633-641.
- SCHÄFER E., FROHNMEYER H., KUNKEL T. (1996): Signaltransduktion lichtinduzierter Prozesse in Pflanzen. In: Signalumwandlung und Informationsverarbeitung. Nova Acta Leopoldina 72 (294).
- SCHÄFER E., KUNKEL T., FROHNMEYER H. (1997): Signal transduction in the photocontrol of chalcone synthase gene expression. Plant Cell Environ. 20: 722-727.
- SCHLAGNHAUFER C.D., GLICK R.E., ARTECA R.N., PELL E.J. (1995): Molecular cloning of an ozone-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate-synthase cDNA and its relationship with a loss of *rbcS* in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. Plant Mol. Biol. 28: 93-103.
- SCHNEIDERBAUER A., BACK E., SANDERMANN H. JR., ERNST D. (1995): Ozone induction of extensin mRNA in Scots pine, Norway spruce and European beech. New. Phytol. 130: 225-230.
- SCHNITZLER J.-P., JUNGBLUT T.P., HELLER W., KÖFFERLEIN M., HUTZLER P., HEINZMANN U., SCHMELZER E., ERNST D., LANGEBARTELS C., SANDERMANN H. JR. (1996): Tissue localization of u.v.- B-screening pigments and chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. New Phytol. 132: 247-258.
- SCHNITZLER J.-P., LANGEBARTELS C., HELLER W., LIU J., LIPPERT M., DÖHRING T., BAHNWEIG G., SANDERMANN H. JR. (1999): Ameliorating effect of UV-B radiation on the response of Norway spruce and Scots pine to ambient ozone concentrations. Global Change Biol. 5: 83-94.
- SCHRAUDNER M., LANGEBARTELS C., SANDERMANN H. (1997): Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environmental pollutant ozone. Physiol. Plant. 100: 274-280.
- SCHÜTT P., SCHUCK H.J., STIMM B. (1992): Lexikon der Forstbotanik, Ecomed, Landsberg

- SECKMEYER G., PAYER H.-D. (1993): A new sunlight simulator for ecological research on plants. *J. Photochem. Photobiol.* 21: 175-181.
- SHARMA Y.K., DAVIS K.R. (1994): Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 105: 1089-1096.
- SHARMA Y.K., DAVIS K.R. (1995): Isolation of a novel *Arabidopsis* ozone-induced cDNA by differential display. *Plant Mol. Biol.* 29: 91-98.
- SHIMAZAKI K., INO M., ZEIGER E. (1986): Blue light-dependent proton extrusion by guard-cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 319: 324-326.
- SHORT T.W., BRIGGS W.R. (1994): The transduction of blue light signals in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 45: 143-171.
- SMEULDERS S.M., GORISSEN A., JOOSTEN N.N., VAN VEEN J.A. (1995): Effects of short-term ozone exposure on the carbon economy of mature and juvenile Douglas firs [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco]. *New Phytol.* 129: 45-53.
- SMITH K.C. (1977): Ultraviolet radiation effects on molecules and cells. In: Smith K.C. (ed.): *The science of photobiology*. Plenum Press New York: 113-142.
- SMITH K.C. (1989): UV radiation effects: DNA repair and mutagenesis. In: Smith K.C. (ed.): *The science of photobiology*. New York Plenum Press: 111-134.
- SOMPAYRAC L., JANE S., BURN T.C., TENEN D.G., DANNA K.J. (1995): Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucl. Acids Res.* 23 (22): 4738-4739.
- SONG P., YAMAMOTO E., ALLEN R.D. (1995): Improved procedure for differential display of transcripts from cotton tissues. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13 (2): 174-181
- STÄDTLER S., ZIEGLER H. (1993): Illustration of the genetic differences in ozone sensitivity between the varieties *Nicotiana tabacum* *Bel W₃* and *Bel B* using various plant systems. *Bot. Acta* 106: 265-276.
- STAPLETON A.E. (1992): Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell* 4: 1353-1358.
- STRID Å. (1993): Alteration in expression of defence genes in *Pisum sativum* after exposure to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Cell Physiol.* 34 (6): 949-953.
- STRID Å., CHOW W.S., ANDERSON J.M. (1990): Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1020: 260-268.
- STRID Å., PORRA R.J. (1992): Alterations in pigment content in leaves of *Pisum sativum* after exposure to supplemental UV-B. *Plant Cell Physiol.* 33: 1015-1023.
- STRID Å., CHOW W.S., ANDERSON J.M. (1994): UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynth. Res.* 39: 475 - 489.

- SULLIVAN J.H., TERAMURA A.H. (1990): Field studies of the interaction between solar ultraviolet-B radiation and drought on photosynthesis and growth in soybean. *Plant Physiol.* 92: 141-146.
- SULLIVAN J.H., TERAMURA A.H. (1994): The effects of UV-B radiation on loblolly pine. 3. Interaction with CO₂ enhancement. *Plant Cell Environ.* 17: 311-317.
- SUN Y., HEGAMER G., COLBURN N.H. (1994): Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells. *Cancer Res.* 54: 1139-1144.
- SURPLUS S.L., JORDAN B.R., MURPHY A.M., CARR J.P., THOMAS B., MACKERNES S.A.-H. (1998): Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. *Plant Cell Environ.* 21: 685-694.
- SUTHERLAND B.M., TAKAYANAGI S., SULLIVAN J.H., SUTHERLAND J.C. (1996): Plant responses to changing environmental stress: cyclobutyl pyrimidine dimer repair in soybean leaves. *Photochem. Photobiol.* 64 (3): 464-468.
- TAYLOR W.C. (1989): Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 211-233.
- TERAMURA A.H. (1980a): Effects of ultraviolet-B irradiances in soybean. Importance of photosynthetically active radiation in evaluating ultraviolet-B irradiance effects on soybean and wheat growth. *Physiol. Plant* 48: 333-339.
- TERAMURA A.H. (1980b): Effects of ultraviolet-B irradiance on soybean. Interaction between ultraviolet-B and photosynthetically active radiation on net photosynthesis, dark respiration and transpiration. *Plant Physiol.* 65: 483-488.
- TERAMURA A.H. (1983): Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants. *Physiol. Plant.* 58: 415-427.
- TERAMURA A.H., BIGGS R.H., KOSSUTH S.V. (1980): Effects of ultraviolet-B and photosynthetically active radiation on net photosynthesis, dark respiration and transpiration. *Plant Physiol.* 65: 483-488.
- TERAMURA A.H., SULLIVAN J.H., LEWIS H. Z. (1990): Interaction of elevated ultraviolet-B radiation and CO₂ on productivity and photosynthetic characteristics wheat, rice and soybean. *Plant Physiol.* 94: 470-475.
- TEVINI M., BRAUN J., FIESER G. (1991): The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet-B radiation. *Photochem. Photobiol.* 53: 329-333.
- TEVINI M., IWANZIK W., THOMA U. (1981): Some effects of enhanced UV-B irradiation on the growth and composition of plants. *Planta* 153: 388-394.

- TEVINI M., TERAMURA A.H. (1989): UV-B effects on terrestrial plants. *Photochem. Photobiol.* 50: 479-487.
- THALMAIR M., BAUW G., THIEL S., DÖHRING T., LANGEBARTELS C., SANDERMANN JR. H. (1996): Ozone and ultraviolet B effects on the defense-related proteins β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco. *J. Plant Physiol.* 148: 222-228.
- THIEL S., DÖHRING T., KÖFFERLEIN M., KOSAK A., MARTIN P., SEIDLITZ H.K. (1996): A phytotron for plant stress research: how far can artificial lighting compare to natural sunlight? *J. Plant Physiol.* 148: 456-463.
- TISHKOFF D.X. JOHNSON A.W., KOLODNER R.D. (1991): Molecular and genetic analysis of the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* strand exchange protein Sep1. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2593-2608.
- TOKARSKA-SCHLATTNER M., FINK A., CASTILLO F.J., CRESPI P., CREVECOEUR M., GREPPIN H., TACCHINI P. (1997): Effects of ozone on the plasma membrane proteins in *Arabidopsis thaliana* (L.) leaves. *Plant Cell Environ.* 20: 1205-1211.
- TOON O.B., TURCO R.P. (1991): Polare Stratosphärenwolken und Ozonloch. *Spektrum der Wissenschaft* Aug.: 42-49.
- TRAUTINGER F., KINDAS-MUGGE I., BARLAN B., NEUNER P., KNOBLER R.M. (1995): 72-kDa heat shock protein is a mediator of resistance to ultraviolet B light. *J. Invest. Dermatol.* 105: 160-162.
- UTANS U., LIANG P., WYNER L.R., KARNOVSKY M.J., RUSSELL M.E. (1994): Chronic cardiac rejection: identification of five upregulated genes in transplanted hearts by differential mRNA display. *Proc. Natl. Acad. Sci* 91 (14): 6463-6467.
- VAN LOON L.C., PIERPOINT W.S., BOLLER T., CONEJERO V. (1994): Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Repr.* 12: 245-264.
- VIERLING E. (1991): The roles of heat shock proteins in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 579-620.
- VÖGELI-LANGE R., BÜRCKERT N., BOLLER T., WIEMKEN A. (1996): Rapid selection and classification of positive clones generated by mRNA differential display. *Nucl. Acids Res.*, Vol. 24 (7): 1385-1386.
- WARNER C.W., CALDWELL M.M. (1983): Influence of photon flux density in the 400-700 nm waveband on inhibition of photosynthesis by UV-B (280-320 nm) irradiation in soybean leaves: separation of indirect and immediate effects. *Photochem. Photobiol.* 38: 341-346.
- WARPEHA K.M.F., HAMM H.E., RASENICK M.M., KAUFMAN L.S. (1991): A blue-light-activated GTP-binding protein in the plasma membranes of etiolated peas. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 88: 8925-8929.

- WEGENER A., GIMBEL W., WERNER T., HANI J., ERNST D., SANDERMANN JR. H. (1997): Molecular cloning of ozone-inducible protein from *Pinus sylvestris* L. with high sequence similarity to vertebrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1350: 247-252.
- WELLBURN F.A.M., WELLBURN A.R. (1996): Variable patterns of antioxidant protection but similar ethene emission differences in several ozone-sensitive and ozone-tolerant plant selections. *Plant Cell Environ.* 19: 754-760.
- WERNER R., GUITTON M.-C., MÜHLBACH H.-P. (1995): A tomato cDNA encodes a protein homologous to the eukaryotic ribosomal protein S25. *Plant Physiol. Biochem.* 33 (3): 373-377.
- WESTERMEIER R. (1990): Hochauflösende 2D-Elektrophorese. In: Westermeier R. (ed.): *Elektrophorese-Praktikum*. VCH-Verlag Weinheim New York Basel Cambridge: 215-228.
- WIEDMANN B., SAKAI H., DAVIS T.A., WIEDMANN M. (1994): A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 370 (6489): 434-440.
- WILLEKENS H., VAN CAMP W., VAN MONTAGU M., INZE´D., LANGEBAEELS C., SANDERMANN H. JR. (1994): Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Plant Physiol.* 106: 1007-1014.
- WILKINSON J.Q., LANAHAHAN M.B., CONNER T.W., KLEE H.J. (1995): Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Mol. Biol.* 27: 1097-1108.
- WILSON M.I., GREENBERG B.M. (1993): Protection of the D1 photosystem II reaction center protein from degradation in ultraviolet radiation following adaptation of *Brassica napus* L. to growth in ultraviolet-B. *Photochem. Photobiol.* 57 (3): 556-563.
- WOOL I.G. (1996): Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *TIBS* 21: 35-36.
- YALPANI N., ENYEDI A.J., LEON J., RASKIN I. (1994): Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* 193: 372-376.
- YOST H.J., LINDQUIST S. (1986): RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell* 45: 185-193.
- YOTOV W.V., MOREAU A., ST.-ARNAUD R. (1998): The alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex functions as a transcriptional coactivator. *Mol. Cell Biol.* 18 (3): 1303-1311.
- YU G.-H., SUNG S.-K., AN G. (1998): The nopaline synthase (*nos*) promoter is inducible by UV-B radiation through a pathway dependent on reactive oxygen species. *Plant Cell Environ.* 21: 1163-1171.

- ZHANG J., HU X., HENKOW L., JORDAN B.R., STRID Å. (1994): The effects of ultraviolet-B radiation on the CF₀F₁-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1185: 295-302.
- ZHU J.-K., HASEGAWA P.M., BRESSAN R.A., NIU X. (1996): Multiple transcripts of a calcium-binding protein gene from *Atriplex nummularia* are differentially regulated by developmental and environmental stimuli. *Physiol. Plant.* 97: 499-506.
- ZINSER C., ERNST D., SANDERMANN JR.H. (1998): Induction of stilbene synthase and cinnamyl alcohol dehydrogenase mRNAs in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Planta* 204: 169-176.

VII. ANHANG

II.13. Sequenzieren der UV-Buchenklone

1. Sequenzierung mittels des T 7 Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (Amersham Buchler):

Die 4 verschiedenen Sequenzierungsreaktionen wurden getrennt in einem 17,5 µl-Ansatz durchgeführt:

1 µl Primer (0,5 pmol/µl), 2 µl Reaktionspuffer, 0,1 µg Plasmid-DNA, 1 µl 7-deaza-dGTP Cycle-Mix, 0,5 µl α -[³⁵S]-dATP (10 µCi/µl, 1000 Ci/mmol), 5 µl Wasser und zuletzt wurden 2 µl Thermo Sequenase zugesetzt. Für die Amplifikation wurden folgende Bedingungen gewählt: 30 bis 60 Zyklen 15 s bei 95°C zum Aufschmelzen der DNA-Stränge und das Anlagern der Primer 30 s bei 60°C (je nach spezifischer Primersequenz).

Die Termination des Markierungsschrittes erfolgte durch Zugabe von je 4 µl der entsprechenden ddNTPs (ddGTP zu je 3,5 µl des G markierten Ansatzes usw.). Die Termination wurde für 30 – 60 Zyklen 30 s bei 95°C und 60-120 s bei 72°C durchgeführt.

Im Anschluß daran wurde jeder Terminationsreaktion je 4 µl Stopplösung zugegeben. Die Ansätze wurden entweder bis zum Laden auf ein Sequenziergel bei (–20°C) gelagert oder direkt auf ein Sequenziergel geladen. Dazu mußten die Proben für 2-10 min bei 70°C erhitzt werden und direkt im Anschluß daran je 3 – 3,5 µl Reaktionsansatz auf das Sequenziergel aufgetragen werden.

2. Sequenzierung mittels des „Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit“ (Amersham Buchler):

Zuerst wurden die Terminationsmische bei 4°C vorbereitet: 2 µl des Nukleotid-Mastermixes (dITP) und je 0,5 µl des entsprechenden [³³P]-ddNTP (G, A, C, T). Anschließend wurden die Reaktionsmische hergestellt: 2 µl Reaktionspuffer, 0,5 µg Plasmid-DNA, 2,5 pmol Primer, auf ein Volumen von 18 µl mit Wasser aufgefüllt und 2 µl Thermo Sequenase (4 U/µl) zugegeben. Je 4,5 µl des Reaktionsmixes wurden zu 2,5 µl des bereits vorbereiteten Terminationsmixes pipettiert. Dann wurde die Sequenzierungsreaktion für 30 Zyklen bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 30 s bei 95°C, 30 s bei 50°C und 5-10 min bei 60°C. Zu diesem Ansatz wurden dann jeweils 4 µl Stopplösung addiert und die Ansätze wurden entweder bei (–20°C) gelagert oder direkt auf einem Sequenziergel elektrophoretisch aufgetrennt. Zuvor wurden die Proben 2 – 10 min bei 70°C denaturiert und pro Spur je 5 µl Probe aufgetragen.

III.1. 2D-PAGE des löslichen Gesamtproteins der Primärblätter

Tab. 31: Überblick über die insgesamt quantifizierte löslichen Gesamtproteine unter erhöhter UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle mit den MG- und pI-Angaben. Wurde ein Polypeptid neu gebildet oder konnte nicht mehr nachgewiesen werden, so wurde es in die Tabelle mit „+“ aufgenommen (i = UV-B-induziert; r = UV-B-reprimiert).

MG	pI	Spot	Ernte									
			2		3		4		5		6	
			i	r	i	r	i	r	i	r	i	r
		1										
77,1	7,6	2		2	1,5			5,5		1,5		4,9
55	7,5	3		1,7	2,8			2	1,2			1,3
47,6	7,6	4		2,8	1,9			1,4	1,4		1,3	
43,7	8,2	5		2,3		1,6		2,7		1,2	1,2	
41,7	7,9	6		1,1	2,3			4,8	3,7			2,1
40,3	7,8	7		4,1	1,4		1,2		1,5		1,4	
38,9	7,85	8		1,7		1,4	2,5		1			1,3
43,2	9,4	9		1,1	1,1			5,1	5,6			+
65,3	5,3	10		1,4	2			3,1	1,1			6
59,8	5,4	11		1	2,9			1,3	3,6			1,2
46,2	5,7	12	1,1			1,3	+			1,4	1,2	
43,2	5,65	13		3,3		+			+			2
44,2	7,2	14		3,3	1,2		1,3		2,4			1,3
44,2	6,9	15	1,2		2,5		+		2,8			3,1
40,3	7	16	3,4		2			1,1	1,9			1,1
41,3	6,7	17		3,3	1,4		+		1,9		1,4	
31,5	7,35	18		1	3,1			2,2	+		1,5	
30,5	7,35	19		1,6	4,8			1,3	4,2			3,4
29,9	7,7	20		1,8	1,7			+	3,1			+
32,2	5,8	21		1,1		1,7		1,6	1		1,2	
30,1	5,85	22		1,5		2	+		1,7			4,7
29,5	6,65	23		2,5	4		1,2		3,5		2,4	
27,9	6,95	24		1,5	1,9			3,6	2,1		2,5	
27,5	6,75	25		1,4	1,8			2,1	2,1		1,8	
24,3	7,25	26	1,2		2,1			1,8	5			1,5
21,1	7	27		3	+		1,1		+			1,4
17	6,8	28	+		1,8		1,9		1,8		2	
16	5,2	29		1,7	2,3			+		+	2	
15,3	4,5	30	1,1		2			+		1,2	1,1	
12,7	4,2	31		1,4	1,3			+		1,1		1,2
12,7	5,7	32	1,1		2,1							+
26,7	6,4	33		2,3		1,4			+			1,2
29,6	6,3	34		2,4		+	+		1			1,6
54,7	6,25	35		5,3		1,1		1,2		+	1,6	
45,2	7,6	36						1		+		

5. Ernte

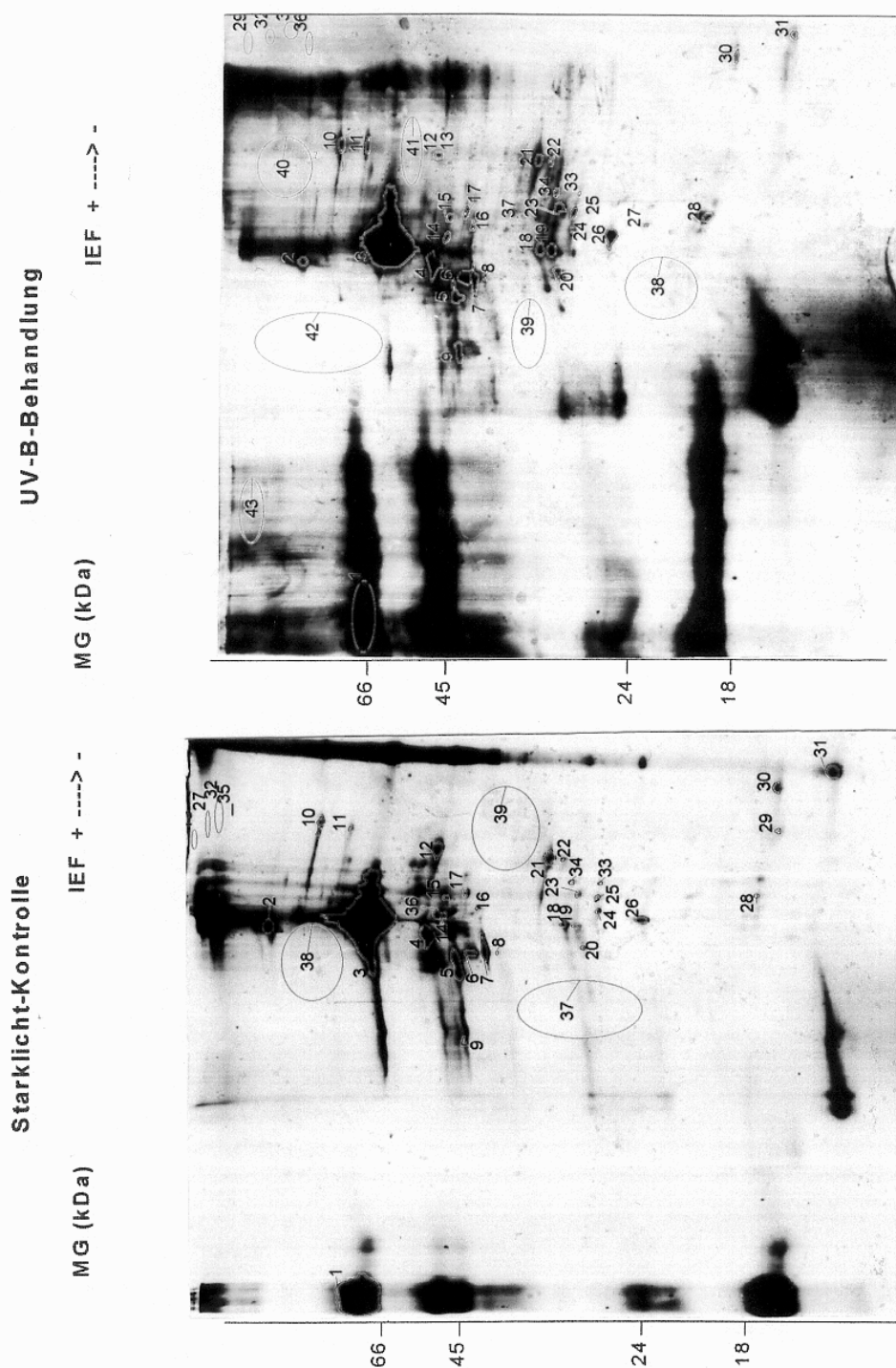


Abb. 50: Silberfärbung der 2D-PAGE Analyse des löslichen Gesamtproteins isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge zum 5. Erntezeitpunkt (s. Ernteschema S. 42). Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen exponiert ($\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $\text{UV-B}_{\text{BE}} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$) und für 18 h unter UV-B exponiert ($\text{UV-B}_{\text{BE}} 720 \text{ mW m}^{-2}$). Jeweils $80 \mu\text{g}$ Protein wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die Spots sind mit den identischen Nummern gekennzeichnet. Die Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 36 – wurden zur Hintergrundermittlung bei der Quantifizierung der Proteinspots berücksichtigt.

6. Ernte

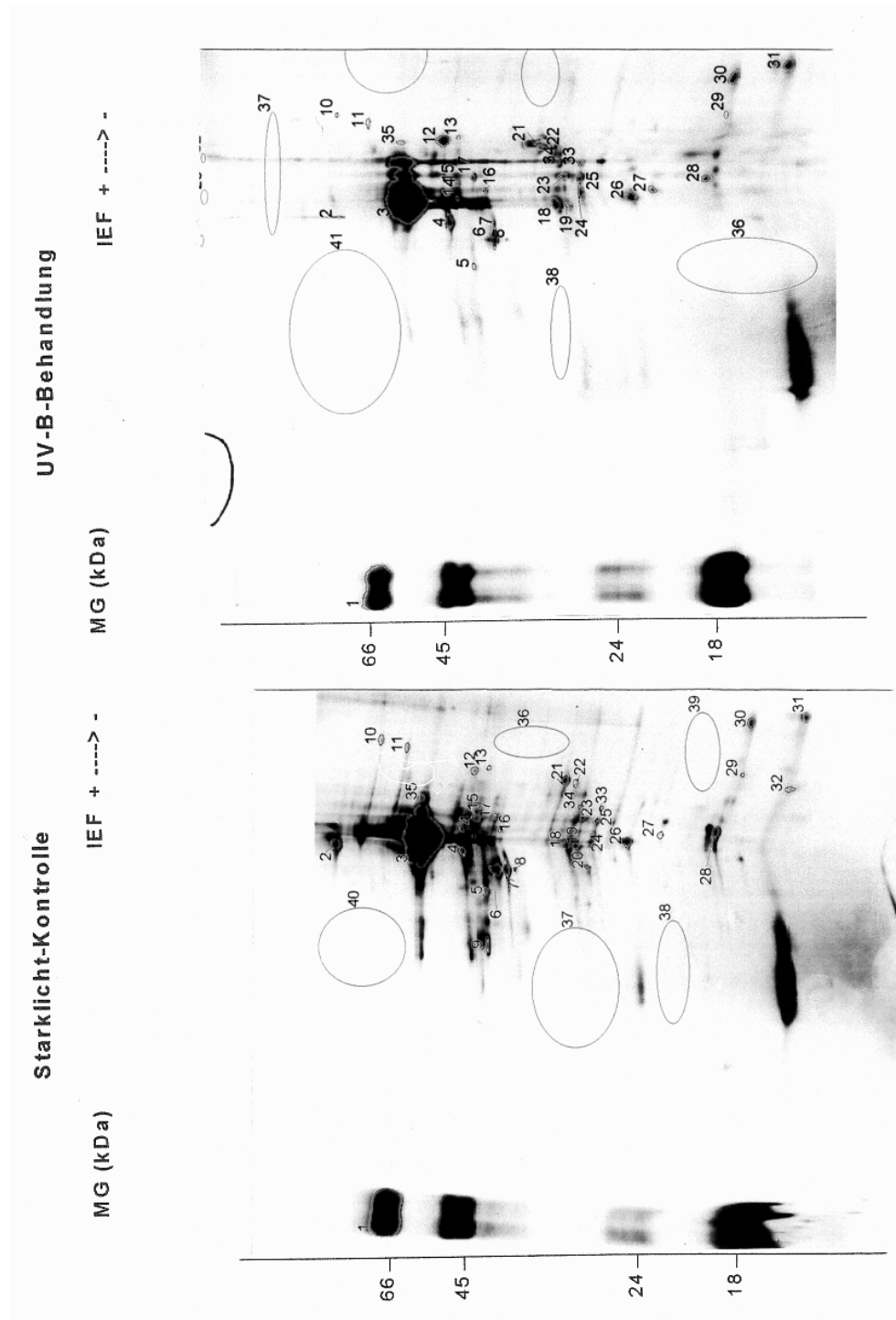


Abb. 51: Silberfärbung der 2D-PAGE Analyse des löslichen Gesamtproteins isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge zum 6. Erntezeitpunkt (s. Ernteschema S. 42). Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen exponiert ($\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $\text{UV-B}_{\text{BE}} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$) und für 48 h unter UV-B exponiert ($\text{UV-B}_{\text{BE}} 720 \text{ mW m}^{-2}$). Jeweils $80 \mu\text{g}$ Protein wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die Spots sind mit den identischen Nummern gekennzeichnet. Die Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 36 – wurden zur Hintergrundermittlung bei der Quantifizierung der Proteinspots berücksichtigt.

1.3. Tageszeitliche Änderungen des Gesamtproteinmusters unter Starklicht-Exposition bezogen auf den Starklicht-Nullwert

Tab. 32: Zusammenfassung der insgesamt quantifizierten löslichen Gesamtproteine nach Starklicht-Exposition im Tagesgang mit den MG- und pI-Angaben. Wurde ein Polypeptid neu gebildet oder konnte nicht mehr nachgewiesen werden, so wurde es in die Tabelle mit „+“ aufgenommen. (i = UV-B-induziert; r = UV-B-reprimiert).

MG	pI	Spot	Ernte									
			2		3		4		5		6	
			i	r	i	r	i	r	i	r	i	r
		1										
77,1	7,6	2	4,4		2,2		3,8		1,6			1,3
55	7,5	3	1			1,7	1,8		1,5			1,3
47,6	7,6	4	1,5			1,3	3		2,9			3,1
43,7	8,2	5	1,5		1,6		1,8		3,7			2,7
41,7	7,9	6		1,4		1,8	1,6			2,7		1,8
40,3	7,8	7	1,1			1,3		1,2		1,8		2,8
38,9	7,85	8	5,4		3,7		1,3		2,5		2,2	
43,2	9,4	9		1,7		1,8	1,8			3,1		2,2
65,3	5,3	10		1,1		2,5		1,4		1,8		1,3
59,8	5,4	11		1,4		4,1		1,6		6,4		1,9
46,2	5,7	12	1,1			1,1		+		1,3		1,6
43,2	5,65	13	1,9			3,3		+		+		2
44,2	7,2	14		1		2,7		2,3		2,7		4,2
44,2	6,9	15		3,9		5,2		+		5,2		2,5
40,3	7	16		4,5		2,1		2,2		4,1		3
41,3	6,7	17	2,6			1		+	1,8			1,1
31,5	7,35	18		1,4		1,6		1		2,4		2,6
30,5	7,35	19		1,3		1,7		1,4		1,5		1,1
29,9	7,7	20	2,1		1,8		4,2			1,4		1,5
32,2	5,8	21		1,9		1		3		2		2,5
30,1	5,85	22	1,1		1,7			+		2,3	1,6	
29,5	6,65	23	2			1,2		1		1,2		4,3
27,9	6,95	24		1,8		1,6		1,2		4,6		4,3
27,5	6,75	25		1,5	1,1		1,1			1,6		5,6
24,3	7,25	26		1,5	2,2		1,2			1,8		1,3
21,1	7	27	1,7			+		2		+		1
17	6,8	28		+	1,2			1,8		3		4,1
16	5,2	29	1,1		1,3			2,1		3		5,6
15,3	4,5	30	1			1,5		2		1,3		1,8
12,7	4,2	31		1,3		1,8		2,9		2		2,4
12,7	5,7	32		2,1		1,2		+		+		2,1
26,7	6,4	33	1,3			1		+		2,7		1,7
29,6	6,3	34	1,5			1,1		+		1,5		2,6
54,7	6,25	35	+		+		+				+	
45,2	7,6	36			+		+		+			

2. 2D-PAGE der *in vitro* translatierten Proteine

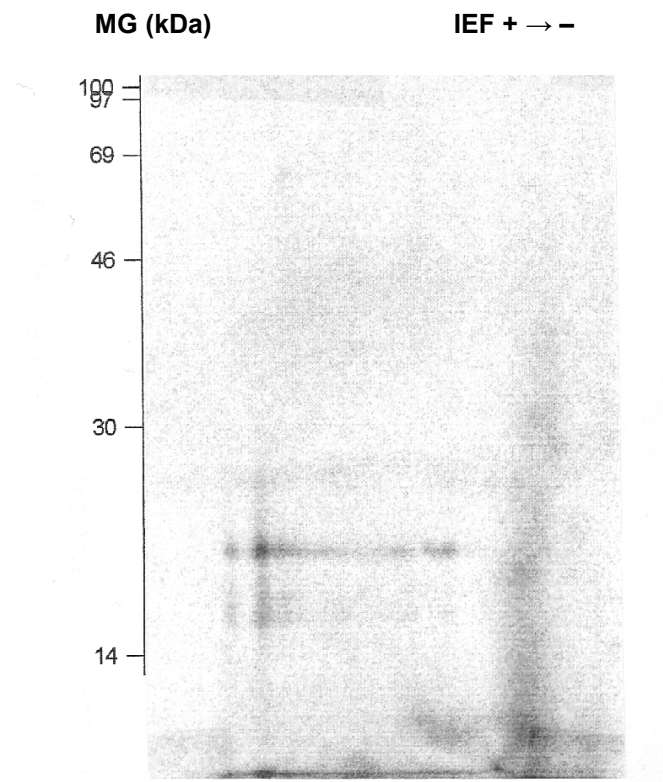


Abb. 52: Autoradiographie der 2D-PAGE Analyse des Reticulocaten-Lysats ohne poly (A)⁺-RNA (=Leerwert).

Ernte 6

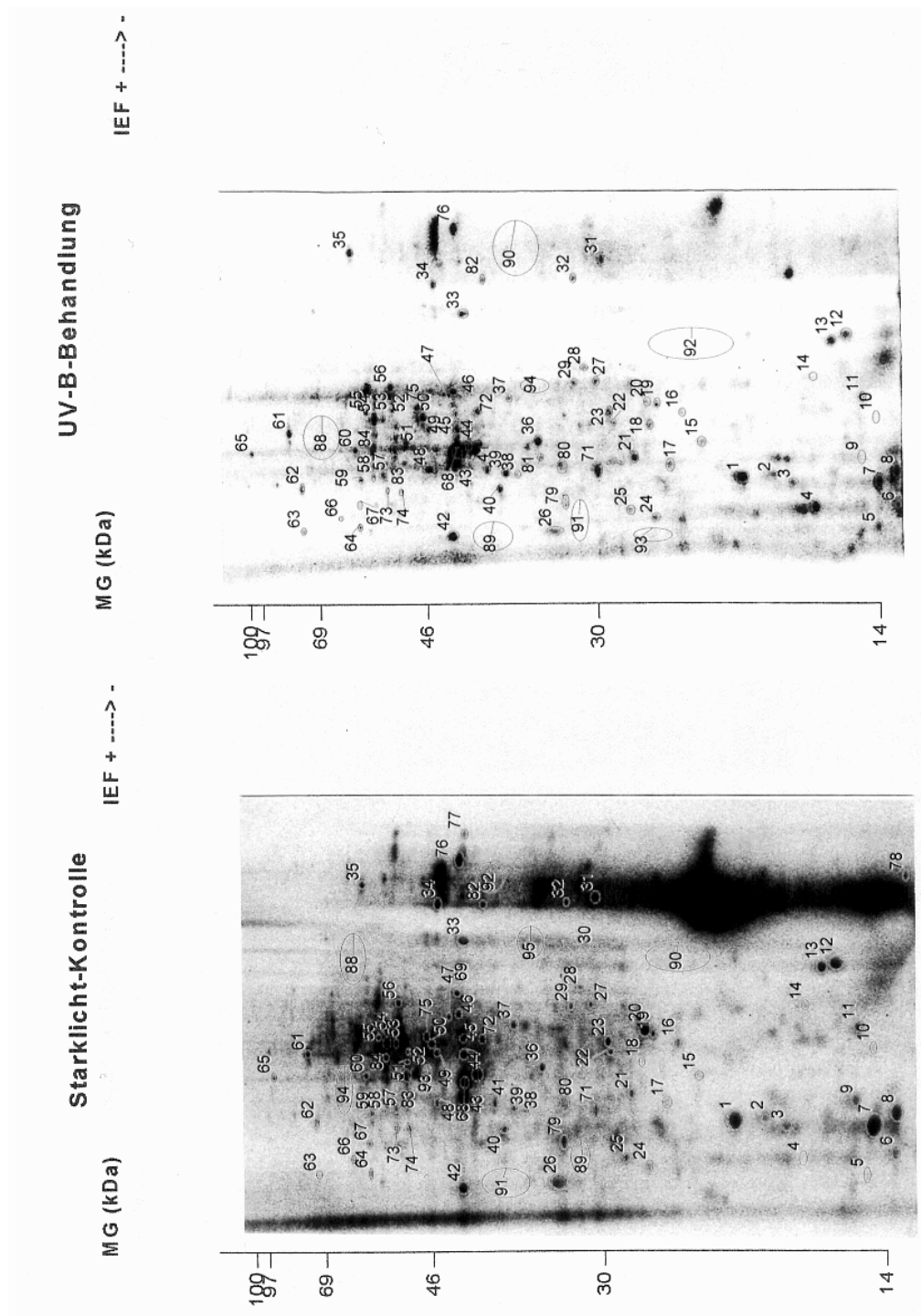


Abb. 53: Autoradiographie der 2D-PAGE Analyse der *in vitro* translatierten poly (A)⁺-RNA isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge. Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, UV-B_{BE} < 0,5 mW m^{-2}) exponiert. Erntezeitpunkt 6 (s. Ernteschema S. 50) wird gezeigt: die Starklicht-Kontrolle (unten) und die entsprechende UV-B-behandelte Probe (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV-B_{BE} 430 mW m^{-2} ; oben). Die *in vitro* Translation der isolierten poly (A)⁺-RNA erfolgte mittels einem Reticulocytensylat und jeweils 500 000 dpm TCA-unlösliche Radioaktivität wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die vergleichbaren Spots sind mit identischen Nummern gekennzeichnet. Die Mittelwerte der Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 88 – wurden zur Hintergrundsermittlung bei der Quantifizierung der *in vitro* translatierten Polypeptide abgezogen.

Ernte 7

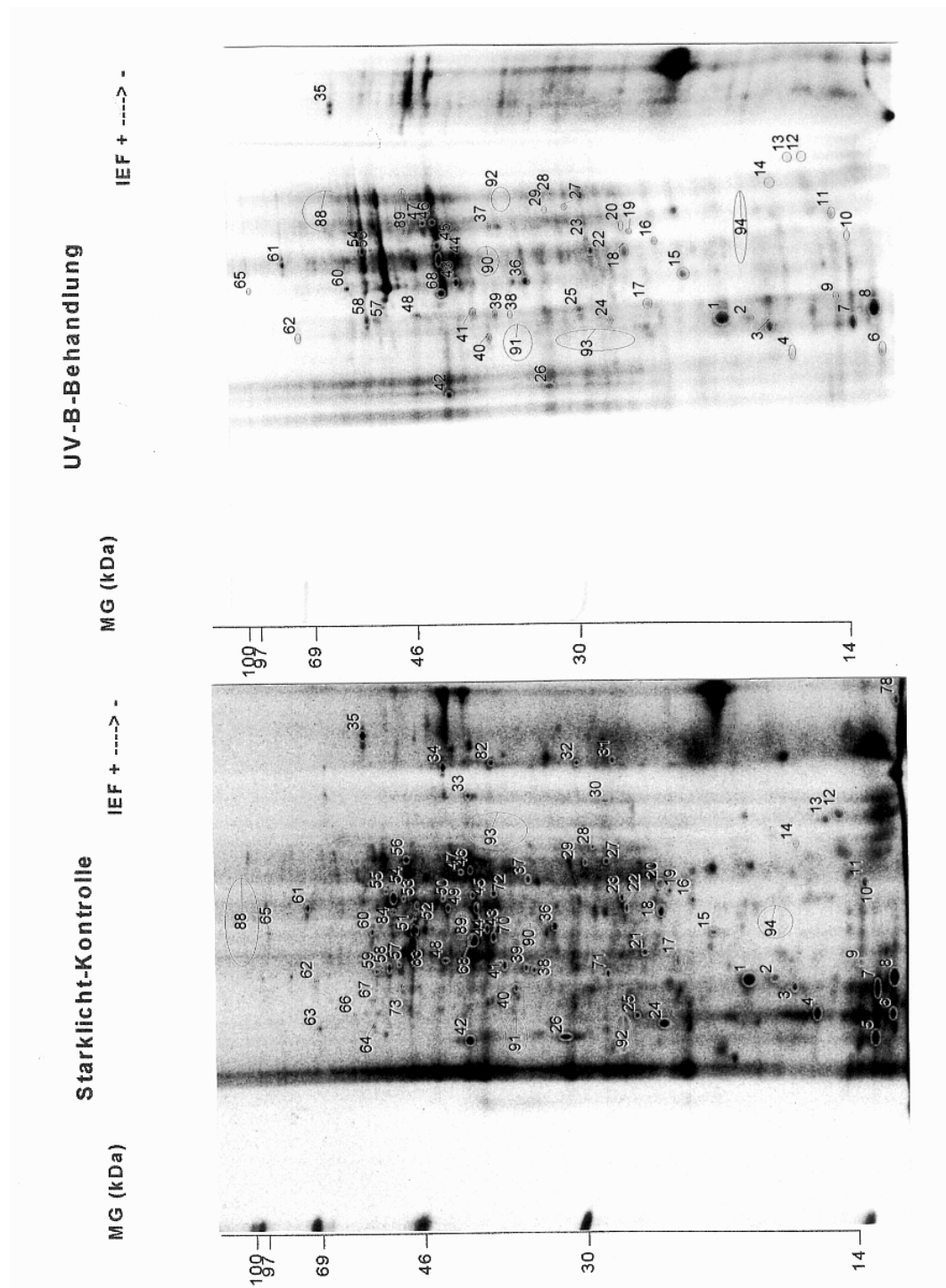


Abb. 54: Autoradiographie der 2D-PAGE Analyse der *in vitro* translatierten poly (A)⁺-RNA isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge. Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, UV-B_{BE} < 0,5 mW m^{-2}) exponiert. Erntezeitpunkt 7 (s. Ernteschema S. 50) wird gezeigt: die Starklicht-Kontrolle (unten) und die entsprechende UV-B-behandelte Probe (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV-B_{BE} 430 mW m^{-2} ; oben). Die *in vitro* Translation der isolierten poly (A)⁺-RNA erfolgte mittels einem Reticulocytensat und jeweils 500 000 dpm TCA-unlösliche Radioaktivität wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die vergleichbaren Spots sind mit identischen Nummern gekennzeichnet. Die Mittelwerte der Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 88 – wurden zur Hintergrundermittlung bei der Quantifizierung der *in vitro* translatierten Polypeptide abgezogen.

Ernte 8

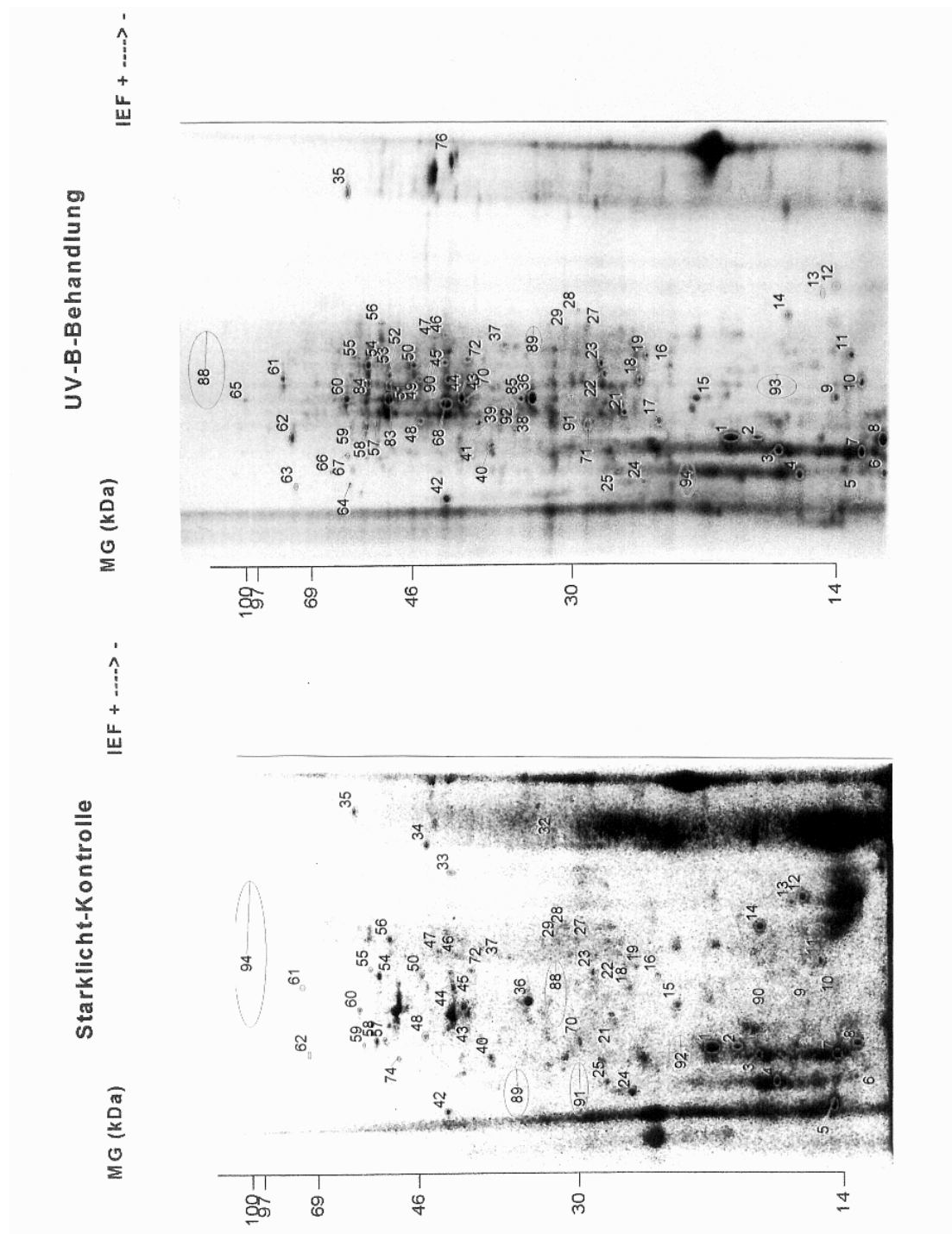


Abb. 55: Autoradiographie der 2D-PAGE Analyse der *in vitro* translatierten poly (A)⁺-RNA isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge. Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, UV- B_{BE} < 0,5 mW m^{-2}) exponiert. Erntezeitpunkt 8 (s. Ernteschema S. 50) wird gezeigt: die Starklicht-Kontrolle (unten) und die entsprechende UV-B-behandelte Probe (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV- B_{BE} 430 mW m^{-2} ; oben). Die *in vitro* Translation der isolierten poly (A)⁺-RNA erfolgte mittels einem Reticulocytensylat und jeweils 500 000 dpm TCA-unlösliche Radioaktivität wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die vergleichbaren Spots sind mit identischen Nummern gekennzeichnet. Die Mittelwerte der Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 88 – wurden zur Hintergrundermittlung bei der Quantifizierung der *in vitro* translatierten Polypeptide abgezogen.

Ernte 9

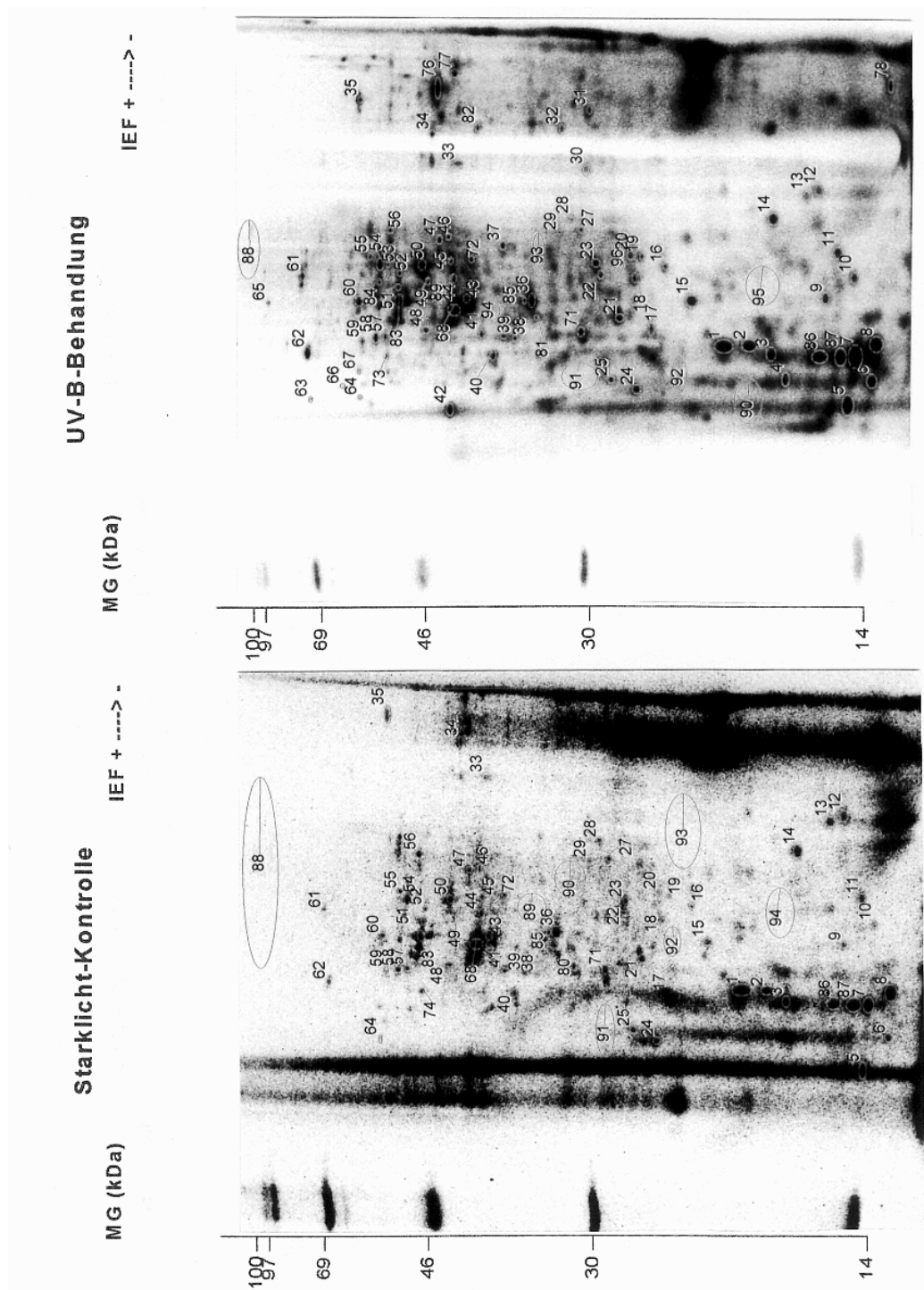


Abb. 56: Autoradiographie der 2D-PAGE Analyse der *in vitro* translatierten poly (A)⁺-RNA isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge. Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, UV-B_{BE} < 0,5 mW m^{-2}) exponiert. Erntezeitpunkt 9 (s. Ernteschema S. 50) wird gezeigt: die Starklicht-Kontrolle (unten) und die entsprechende UV-B-behandelte Probe (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV-B_{BE} 430 mW m^{-2} ; oben). Die *in vitro* Translation der isolierten poly (A)⁺-RNA erfolgte mittels einem Reticulocytensylat und jeweils 500 000 dpm TCA-unlösliche Radioaktivität wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die vergleichbaren Spots sind mit identischen Nummern gekennzeichnet. Die Mittelwerte der Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 88 – wurden zur Hintergrundsermittlung bei der Quantifizierung der *in vitro* translatierten Polypeptide abgezogen.

Ernte 10

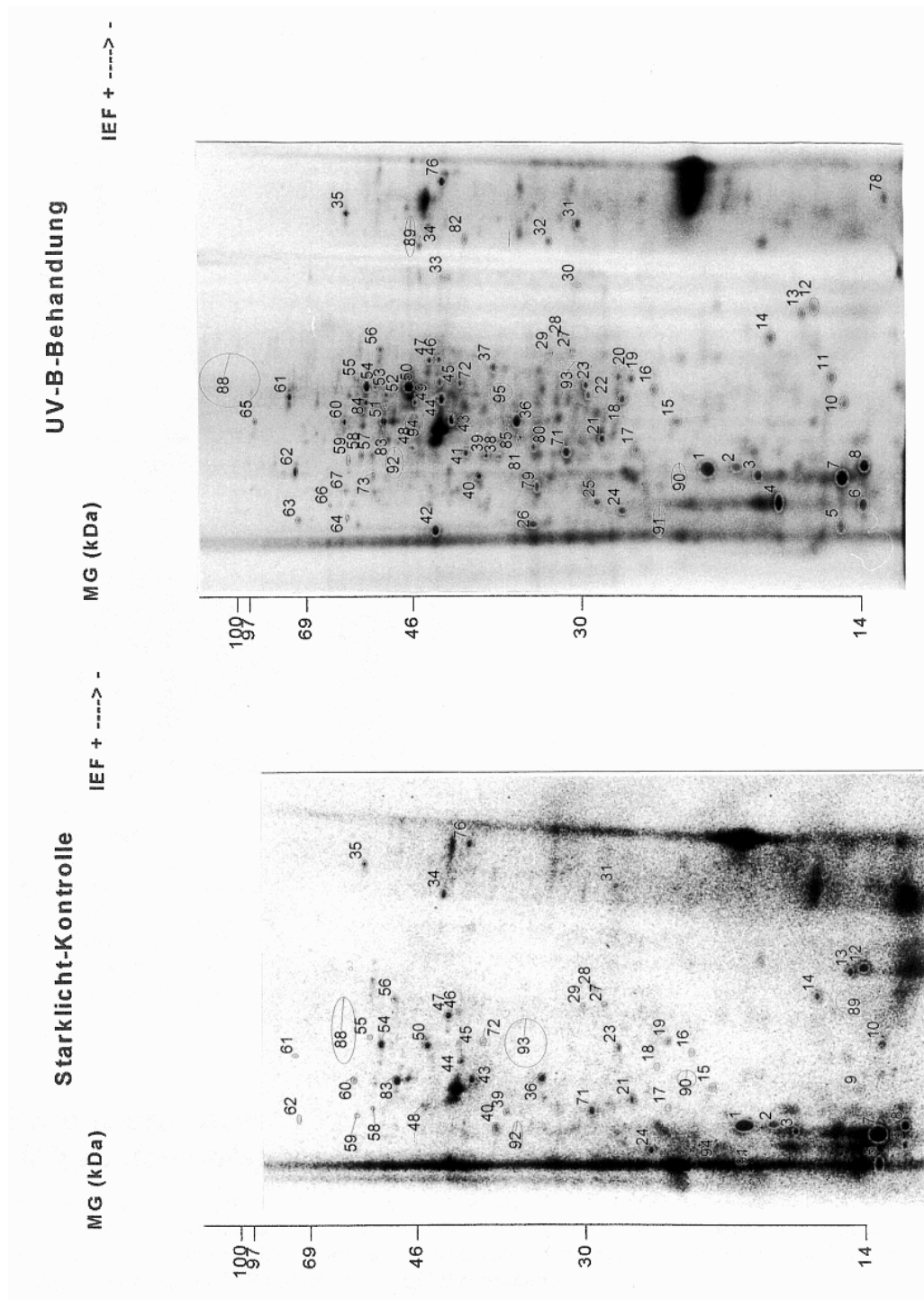


Abb. 57: Autoradiographie der 2D-PAGE Analyse der *in vitro* translatierten poly (A)⁺-RNA isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge. Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, UV-B_{BE} < 0,5 mW m^{-2}) exponiert. Erntezeitpunkt 10 (s. Ernteschema S. 50) wird gezeigt: die Starklicht-Kontrolle (unten) und die entsprechende UV-B-behandelte Probe (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV-B_{BE} 430 mW m^{-2} ; oben). Die *in vitro* Translation der isolierten poly (A)⁺-RNA erfolgte mittels einem Reticulocytensylat und jeweils 500 000 dpm TCA-unlösliche Radioaktivität wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die vergleichbaren Spots sind mit identischen Nummern gekennzeichnet. Die Mittelwerte der Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 88 – wurden zur Hintergrundsermittlung bei der Quantifizierung der *in vitro* translatierten Polypeptide abgezogen.

Ernte 11: UV-B-Behandlung

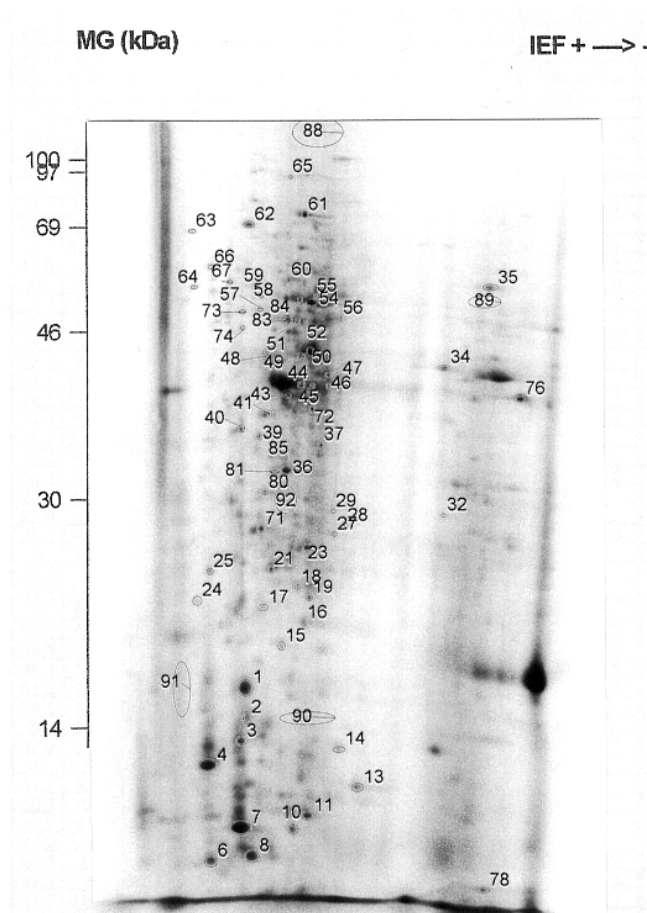


Abb. 58: Autoradiographie der 2D-PAGE Analyse der in vitro translatierten poly(A)⁺-RNA isoliert aus den Blättern der 10-wöchigen Buchensämlinge. Die Sämlinge wurden unter Starklicht-Bedingungen (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, UV-B_{BE} < 0,5 mW m^{-2}) exponiert. Erntezeitpunkt 11 (s. Ernteschema S. 50) wird gezeigt: die entsprechende UV-B-behandelte Probe (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV-B_{BE} 430 mW m^{-2}). Die in vitro Translation der isolierten poly(A)⁺-RNA erfolgte mittels einem Reticulocytenlysats und jeweils 500 000 dpm TCA-unlösliche Radioaktivität wurde auf die erste Dimension aufgetragen. Die vergleichbaren Spots sind mit identischen Nummern gekennzeichnet. Die Mittelwerte der Flächen – gekennzeichnet mit Nummern größer 88 – wurden zur Hintergrundermittlung bei der Quantifizierung der in vitro translatierten Polypeptide abgezogen.

2.2. UV-B-induzierte bzw. -reprimierte in vitro translatierte Proteine im Vergleich zu den entsprechenden Starklicht-Kontrollen

Tab. 33: Zusammenfassung der insgesamt quantifizierten in vitro translatierten Proteine unter erhöhter UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle mit den MG- und pI-Angaben (s. Ernteschema S. 50). Wurde ein Polypeptid neu gebildet oder konnte nicht mehr nachgewiesen werden, so wurde es in die Tabelle mit „+“ aufgenommen (i = UV-B-induziert; r = UV-B-reprimiert).

			Ernte													
		Spot	3		4		5		6		7		8		9	
MG	pl		i	r	i	r	i	r	i	r	i	r	i	r	i	r
20.7	5.2	1														
19.5	5.25	2		1.8		1.9	1.4		1.3		1		1.5		1.4	
17.8	5.1	3	2			2.6		1.3	1		1.8		3.4		1.1	
16.6	4.5	4	4		2.5			2.2	+			64.3	1.3		+	
13.5	4.2	5	+		2.2		2.3		+					3.6	1.8	
13	4.6	6	3.4			1.4	1.6		1			17.4	2.6		3.3	
13.6	5.1	7		1.7		5.6	1			2.5		3.6	1.9		5.4	
13	5.3	8	6			1.7	2		1.3			1.5	6.7		1.1	
14.7	5.5	9		1.6		8.6		3		2.2		1.3	1.9		1.8	
13.8	6.5	10		1.3		4.9		1.8	1.1				4.2		2	
14.5	6.85	11		2		4.9		2		1.4		6	1.6			1.1
15.5	8	12		1.9		2.4		1.2		2.1				11.5		1.9
16	7.9	13		7.8		10.2		2.2		1.6				+		4
17.7	7.2	14		6.9		2.9		2.3	1.1					+		
23.3	6	15		1.1		4.4	1.1		+		2		2.3		2.2	
24.7	6.55	16		2.4		13.7		3.7		1.5		3	1.7		1	
25.8	5.5	17	1.3			2	1.5		21.3			1.3	+		1.9	
27.7	6.25	18	3.4			1.1			+			1.4	2.2		2.1	
26.5	6.75	19		1.8		25.8		1.3		1.4		7.8	2.3		2.1	
27.4	6.8	20		6.8		14.3		2.5		8.3		5.4			2.9	
28.7	5.65	21		1.1		3.8	1.2		2.3				3.8		1.6	
30.2	6.4	22		3.1		5.2		1.2		2	1.4		5.1		2.7	
30.5	6.6	23	1.1			15.2		1.2		1.6		3.2	3.1		1.8	
26.7	4.35	24	2.2		1.1			1.4	2.9			8.7		2.6	1	
28.8	4.5	25	1.1			2.3		1.5	1.1			1.2	1.4			1.5
35.9	4.1	26	1			4.9	1			1.8		1.7				
32	7.3	27		3.4		27.7		2	1.2			5.2				1.5
32.7	7.55	28		2.2		24		3.8	1.4			1.7		146.3		7.6
33.9	7.25	29		2.9		24.8		1.8	1			6.4		1.3		1.6
32	8.3	30		6.8	1.1			1.4		+					+	
31.8	9.2	31		2.9		50		3.3		3.3						
34.5	9.1	32		1.8		3.6		2		2.3						
46.8	8.4	33	1.2			1.8	1.1			1.5				+	1	
51.5	9.1	34		5.5		5		1.1		4.1				+		2.8
66.1	9.4	35		4.1		3.8	1.1			1		4.2	3.2			1
38	6.1	36	1.1			4.2	1.8		1.9			1.2	2.7			1
40.9	6.9	37	1.6			+		1.9		2		2.4	6.8		+	
40	5.35	38		1.1		3.2		1	1.8			5.6			2	
41.7	5.4	39	1			3.4	3.1		3.2			1.7			1.6	
40.4	5	40	1			1.3	1.5		1.3			2.5	2.6		1.7	
43.9	5.5	41		3.2		11.1	1.5		1.5			1.9			1.2	
46.9	3.95	42	1.4			5.5	2.1		1.1			3.4	7.4			
46.2	6	43		1.1		5		1.2		2	1.2		3.2		1.1	
47.3	6.35	44		2.7		10.5		1.8		1.9	1.4		3		1.7	
47.9	6.65	45		1.8		24.5		5.1		2.7	1.9		3.6		1.7	
47.3	7.1	46		1.5		7.5		2	1.3		1.1		2.3		1.1	
50	7	47	2.2			40.2	1.6			1.4	1.3		1.6			1.1
50.9	5.5	48		2.2		4.7	1.4		3.3			1.9	3.1			1.1
52.7	6.4	49		5.2		10.2		1.7		2.8					3.4	
53.1	6.55	50		1		4	1.6		1.1				8		3.1	
57.3	6.2	51		2.5		10.1		1.7		1.3					1.7	
57.3	6.4	52		3		7.5		1.4		2					2.1	
59.6	6.55	53		2.2		25.9		2.4		3		1.5			+	
61.7	6.55	54		15.6		12.1		1.5		2.3		2.2	6.5		2	
62.8	6.65	55	1.1			9.6		2		2.3			4.3		1.2	
58.6	7.25	56		5.8		31.2		4.3		1.1				1.6		1.9
59.6	5.4	57		2.3		4.3	3.3		1.8			1.5	3.1		1.2	
61.7	5.3	58		2.8		4.7	1.6		6.2			1.4	4.9		1.4	
64.6	5.3	59		8.8		6.7		1.3	1.2				9.1		1.4	
66.1	6	60		2.9		30		1.4		1.1		1.1	25.6		2.8	
80.4	6.35	61		4.8		27.7		1.6		1		1.6	58.4		6.9	
77.6	5.1	62		6.1		12.1	1.9		3.1						9	
76.7	4.2	63		1.4		20.4	1.4		+				40.1			
66.1	4.2	64		1.8		8.3	1.9		2.2							14.3
90.8	5.95	65		7.5		+	1.4		2						+	
69.2	4.7	66		+		17.6	1.3		2.2							
65.3	4.75	67		+		15.7	2.8		1.2						+	
48.3	5.9	68	1.1			10.6	1.2		1.1		1.8				1.1	
48.8	7.45	69		+		11.6		2.9		+						
45.7	5.95	70		+		+		+					1.6			
32	5.3	71	1.5		1.2		1.3		2.4						1.1	
45.2	6.6	72		1.6		19.6		1.5		1.9			2.7		2	
59.6	5	73		+		3.4	2.8			1.6					+	
56.9	5	74		+		8.4		1.3		1				+		
55	6.65	75		+		+		+		2.6						
49	9.9	76								1.7						
47.3	10.3	77					9.9									
12.9	9.5	78				+	1.6			+						
35.1	4.8	79						2		1.9						
35.9	5.5	80						1.5	1.6							+
37.3	5.7	81						1.2	+						+	
45.7	9.1	82								2.4					+	
57.3	6	83				12.9		1.7	1.1						1.5	
62.4	6.3	84		+		+				2					+	
39.3	6.1	85													1.4	
15.7	5	86													1.5	
14.9	5	87													1.4	

2.2.1. Induzierte *in vitro* translatierte Proteine zur Ernte 3 (nach 3 h UV-B-Exposition) im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle

Tab. 34: *In vitro* translatierte Proteine, die nach 3 h erhöhter UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle (Ernte 3, s. Ernteschema S. 50) induziert wurden. Die MG (kDa) und die pI-Werte (pH-Einheiten) der Proteine sind gruppiert angegeben.

MG-Bereich	saurer pI			neutraler pI		
	MG	pI	Protein	MG	pI	Protein
< 30 kDa	17,8	5,1	3			
	16,6	4,5	4			
	13,5	4,2	5			
	13	4,6	6			
	13	5,3	8			
	27,7	6,25	18			
	26,7	4,35	24			
30 - 60 kDa				40,9	6,9	37
				50	7	47

2.2.2. Reprimierte *in vitro* translatierte Proteine zum Erntezeitpunkt 3 (d.h. nach 3 h UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle)

Tab. 35: Reprimierte *in vitro* translatierte Proteine während der 3-stündigen UV-B-Exposition im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Ernte 3, s. Ernteschema S. 50). Die MG- (kDa) und die pI-Bereiche (pH-Einheiten) der Proteine sind in Gruppen eingeteilt.

MG-Bereich	saurer pI			neutraler pI			basischer pI		
	MG	pI	Protein	MG	pI	Protein	MG	pI	Protein
< 30 kDa	19,5	5,25	2	14,5	6,85	11	15,5	8	12
	13,6	5,1	7	17,7	7,2	14	16	7,9	13
	14,7	5,5	9	24,7	6,55	16			
				26,5	6,75	19			
				27,4	6,8	20			
30 - 60 kDa	30,2	6,4	22	32	7,3	27	32,7	7,55	28
	43,9	5,5	41	33,9	7,25	29	32	8,3	30
	47,3	6,35	44	47,9	6,65	45	31,8	9,2	31
	50,9	5,5	48	59,6	6,55	53	34,5	9,1	32
	52,7	6,4	49	58,6	7,25	56	51,5	9,1	34
	57,3	6,2	51	48,8	7,45	69			
	57,3	6,4	52	45,2	6,6	72			
	59,6	5,4	57	55	6,65	75			
	45,7	5,95	70						
	59,6	5	73						
	56,9	5	74						
> 60 kDa	61,7	5,3	58	61,7	6,55	54	66,1	9,4	35
	64,6	5,3	59						
	66,1	6	60						
	80,4	6,35	61						
	77,6	5,1	62						
	66,1	4,2	64						
	90,8	5,95	65						
	69,2	4,7	66						
	65,3	4,75	67						
	62,4	6,3	84						

2.2.3. Induzierte und reprimierte in vitro translatierte Proteine nach 6 h erhöhter UV-B-Bestrahlung im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle (Ernte 4)

Tab. 36: Reprimierte in vitro translatierte Proteine nach der 6-stündigen UV-B-Exposition im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Ernte 4, s. Ernteschema S. 50). Die MG- (kDa) und die pI-Bereiche (pH-Einheiten) der Proteine sind in Gruppen eingeteilt.

MG-Bereich	saurer pI			neutraler pI			basischer pI		
	MG	pI	Protein	MG	pI	Protein	MG	pI	Protein
< 30 kDa	19.5	5.25	2	14.5	6.85	11	15.5	8	12
	13.6	5.1	7	17.7	7.2	14	16	7.9	13
	14.7	5.5	9	24.7	6.55	16	12.9	9.5	78
	17.8	5.1	3	26.5	6.75	19			
	13	5.3	8	27.4	6.8	20			
	13.8	6.5	10	23.3	6	15			
	25.8	5.5	17						
	28.7	5.65	21						
	28.8	4.5	25						
30 - 60 kDa	30.2	6.4	22	32	7.3	27	32.7	7.55	28
	43.9	5.5	41	33.9	7.25	29	31.8	9.2	31
	47.3	6.35	44	47.9	6.65	45	34.5	9.1	32
	50.9	5.5	48	59.6	6.55	53	46.8	8.4	33
	52.7	6.4	49	58.6	7.25	56	51.5	9.1	34
	57.3	6.2	51	48.8	7.45	69			
	57.3	6.4	52	45.2	6.6	72			
	59.6	5.4	57	55	6.65	75			
	45.7	5.95	70	30.5	6.6	23			
	59.6	5	73	38	6.1	36			
	56.9	5	74	40.9	6.9	37			
	40	5.35	38	46.2	6	43			
	41.7	5.4	39	47.3	7.1	46			
	46.9	3.95	42	50	7	47			
	35.9	4.1	26	53.1	6.55	50			
	48.3	5.9	68						
	57.3	6	83						
> 60 kDa	61.7	5.3	58	61.7	6.55	54	66.1	9.4	35
	64.6	5.3	59	62.8	6.65	55			
	66.1	6	60						
	80.4	6.35	61						
	77.6	5.1	62						
	76.7	4.2	63						
	66.1	4.2	64						
	90.8	5.95	65						
	69.2	4.7	66						
	65.3	4.75	67						
	62.4	6.3	84						

2.2.4. In vitro translatierte Proteine, die während der ersten 3 h UV-B-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle unverändert blieben, aber nach 6 h UV-B reprimiert wurden (Ernte 4)

Tab. 37: Reprimierte in vitro translatierte Proteine zum Erntezeitpunkt 4 (s. Ernteschema S. 50), die während der 3-stündigen UV-B-Exposition im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen unverändert blieben. Die Proteine sind entsprechend dem MG (kDa) und dem pI-Wert (pH-Einheiten) gruppiert.

MG-Bereich	saurer pI			neutraler pI			basischer pI		
	MG	pI	Protein	MG	pI	Protein	MG	pI	Protein
< 30 kDa	13.8	6.5	10				12.9	9.5	78
	23.3	6	15						
	25.8	5.5	17						
	28.7	5.65	21						
	28.8	4.5	25						
30 - 60 kDa	35.9	4.1	26	30.5	6.6	23	46.8	8.4	33
	38	6.1	36	47.3	7.1	46			
	40	5.35	38	53.1	6.55	50			
	41.7	5.4	39						
	46.9	3.95	42						
	46.2	6	43						
	48.3	5.9	68						
> 60 kDa	76.7	4.2	63	62.8	6.65	55			
	57.3	6	83						

2.2.5. Zum Erntezeitpunkt 5 in vitro translatierte Proteine im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle

Tab. 38: Mit der UV-B-Exposition direkt gekoppelte in vitro translatierte Proteine im Vergleich zur entsprechenden Starklicht-Kontrolle in Gruppen unterteilt entsprechend dem MG (kDa) und pI-Wert (pH-Einheiten) (s. Ernteschema S. 50). Das Induktionsverhalten dieser reprimierten Proteine blieb nach anschließender 4-stündiger PAR-Exposition unverändert.

MG-Bereich	saurer pI			neutraler pI			basischer pI		
	MG	pI	Protein	MG	pI	Protein	MG	pI	Protein
< 30 kDa	20.7	5.2	2	26.5	6.75	19	15.5	8	12
	13.6	5.1	7						
30 - 60 kDa	30.2	6.4	22	45.2	6.6	72	51.5	9.1	34
	43.9	5.5	41						
	50.9	5.5	48						
	57.3	6.4	52						
	56.9	5	74						
> 60 kDa	64.6	5.3	59	61.7	6.55	54	66.1	9.4	35
	66.1	6	60						
	90.8	5.95	65						
	69.2	4.7	66						
	62.4	6.3	84						

2.3. Tageszeitliche Änderungen der mRNA-Transkripte unter Starklicht Exposition bezogen auf den Starklicht-Nullwert

Tab. 39: Diese Tabelle (s. nächste Seite) zeigt im Überblick die insgesamt quantifizierten in vitro translatierten Proteine unter Starklicht-Exposition im Tagesgang mit den MG- und pI-Angaben (s. Ernteschema S. 72). Wurde ein Polypeptid neu gebildet oder konnte nicht mehr nachgewiesen werden, so wurde es in die Tabelle mit „+“ aufgenommen (i = UV-B-induziert; r = UV-B-reprimiert).

MG	pl	Spot	Ernte																	
			2		3		4		5		6		7		8		9		10	
			i	r	i	r	i	r	i	r	i	r	i	r	i	r	i	r	i	r
20.7	5.2	1																		
19.5	5.25	2		1.7		1.6	1.1			1.4		2		2		1.8		1.3		1.2
17.8	5.1	3		1.3		2.4	1.2		1.4		1.1		1.3		1.1	1.3				1.1
16.6	4.5	4		2.9		14.8	7.1		3.7		+		1.3		3.5		+			
13.5	4.2	5		3		+		5.5	2.2		+	3.1		1.1			1.1		1.5	
13	4.6	6		1.9		7	1.2		1.2		1.7	1.7			5		3.7			2.3
13.6	5.1	7	2.1			1.1	3.5		2		2.6	1.9			2		1.5	4		
13	5.3	8		3.3		6.4	1.5		1.2		1.1	2.1			3.6		1		1.6	
14.7	5.5	9		1.6		6.9	1.1		1.6		2.1	5.9			5.5		8.5		4.7	
13.8	6.5	10	4.4		2.1		16.6		8.9		1.2	1.8		4.3		2.8		10.4		
14.5	6.85	11	1			1.6	1.9		1.6		1.1		1		1.5		1.7			
15.5	8	12		1.2		2	1.2		1	1.6					2.1		3.1	1.1		
16	7.9	13		1.5		1.2	3.5		2.4					2.5		3.7		1.7		1.1
17.7	7.2	14	1.2		1.5		1.9		1.2		5.2	17.7		2		2		1.2		
23.3	6	15		1.1		2	1.9		1.3		+		1.6		1.2		1.6		3.2	
24.7	6.55	16	1.5			3.2	2.1		1.9		1.2		1.4		3.1		2.9		6.9	
25.8	5.5	17		1.1		1.6	2		1.1		11.5	1.1					2.9		4.7	
27.7	6.25	18			+		+					+		+		+		+		
26.5	6.75	19	1.7			2.5	5.3		1.4		1.5		1.7		3.2		6		2.3	
27.4	6.8	20		1.3			1.7	2.2	1.2		2.1		3.7				16.1			
28.7	5.65	21	1.3			1.1	6.1		4.7		1.2		1.3		2		1		1.3	
30.2	6.4	22	2.1			1.5	2.4		1.1		1.6		1.2		3.4		3.3			
30.5	6.6	23	2			1.8	3.5		1		1.2		1.9		4.8		3		5.5	
26.7	4.35	24	1.2			2.8	1.1		1.2		3.1	2.9		1.2			1.3		1.2	
28.8	4.5	25	1.5			1.9	2.2		1	1.5		1.9			1.3		1			
35.9	4.1	26		1.5		1.6	4.7		1.6		2.2	1.5					+			
32	7.3	27	1.5			3	2.8		1.2		1.3	1.3			3.8		3		5.6	
32.7	7.55	28		1.2		4.9	1.4		1.4		2.1		1.9		6.7		3.6		7.4	
33.9	7.25	29		1		2.4	1.5		1.4		1		1.1		5.6		4.3		9.5	
32	8.3	30		1.4		1.5	2.7		1.9		3.8	1.6					+			
31.8	9.2	31	+		+		+		+		+		+					+		
34.5	9.1	32	+		+		+		+		+		+		+					
46.8	8.4	33	1.1			2.3	1.2		1		1.8		1.3		5.6		3.9			
51.5	9.1	34	1.7		1.4		3.1		1.1		2.2		1.6		4.1		1.8		1.9	
66.1	9.4	35	2.4		1.2		2.8		1.1		1.1	2.4			6.6		2.4		5	
38	6.1	36	3.1			1.4	3.1		2.7		2.4	1.7			1.2	1.2			3	
40.9	6.9	37	1.3			1.4	2.5		3.1		3.1	2			9.8		+			
40	5.35	38	1			2.4	3.1		1.1		2.1	1					4.9			
41.7	5.4	39	1			2.5	3.7		1.3		1.3	1.1					3.2		3.5	
40.4	5	40	1			1.9	1.8		1.3		1.4	1.4			1.7		1.4		1	
43.9	5.5	41		1.9		1.7	2.8		1.3		1.3	1.3					4.8			
46.9	3.95	42	1.2			2.1	3.6		1.4	1.2		1.6			10.6					
46.2	6	43	1			1.8	2.3		1.2	2.4		1.9			3.2		2.4		3.7	
47.3	6.35	44	1.9			1.7	2.9		1.1		1.3		1		7.1		5.1		6.7	
47.9	6.65	45	2.6			2.4	5		1.4		1.1		1.9		8.3		5.8		10.8	
47.3	7.1	46	1.2			2.8	3		1.2		1.3	1.4			9.6		4.6		8.3	
50	7	47		2.1		12	5.7		2.7		2.5	3.3			14.2		4.6		3.3	
50.9	5.5	48		1.1		1.2	4.5		1.2		1.7	1.4			5.7		4.2		6.2	
52.7	6.4	49	1.7		1.2		3.1		1.4		1.9		1.1				7.4			
53.1	6.55	50	1.9		1.3		10		2.5		2.3		3.2		8.9		1.2		1.9	
57.3	6.2	51	1.2			1.2	2.5		2.3		1.5		2.7				5.3			
57.3	6.4	52	1.6			1.1	4.5		1.1		1.9	1.1					4.2			
59.6	6.55	53	2.3			2.5	4.4		1.3		4.5		1.3				+			
61.7	6.55	54	1.4			1	5.4		1.3		2.7		1.2		10.1		4.2		5.7	
62.8	6.65	55	1.7		1.1		4		1.4		2.8		1.6		12.4		2.6		12	
58.6	7.25	56	1.3			2.8	2.7		1.2		1.3		1.3		6.7		4.2		14	
59.6	5.4	57	1.2			1.6	1.2		9.2		3.3		4.4		19.3		7.5			
61.7	5.3	58	1.2			1.7	1.4		9.7		14.8	1.5			4		2.6		36.5	
64.6	5.3	59	1.3			1	2.7		1.1		1.8		1.6		39		6		134.	
66.1	6	60	2.1		1.5		9.4		1.1		1.2		2		13.8		3.5		10.3	
80.4	6.35	61	1.7		1		6.6		1.5		1.2		1.5		156.		20.3		73.2	
77.6	5.1	62	6		9.8		32.1		3.6		1.7		4.6		12.3		3.2			
76.7	4.2	63	2.4		1.5		27.9		2			3.6					+			
66.1	4.2	64	1.4			1.3	8.3		1.2		1.4		2.1				1.4			
90.8	5.95	65	2.8		4.2		41.1		2.7		1.9		1.2				+			
69.2	4.7	66	1.1		1.1		13.3		1.3			1.5	1.4				+			
65.3	4.75	67	1.1		1.2		10.1		1		1.6		1.4				+			
48.3	5.9	68	1			1.3	7		1.8		1.3		3.6				1.1			
48.8	7.45	69	1			2.7	2.5		1.4		1.5		+				+			
45.7	5.95	70		1.2		1.4	5.2		+		+		1.1		3.7		+			
32	5.3	71	1.2			1.5	1.5		1.7			1.2			2		1.9		1.7	
45.2	6.6	72	1.7			3.2	4.5		1		1.7		1.6		7.1		6.2		7	
59.6	5	73		1.4		1.3			1		1.8		1.3				+			
56.9	5	74	1.7		1.2		3.8		1.7		1.5		+		2.8		+			
55	6.65	75	3.3			1.5	9.4		3		4.7		+				+			
49	9.9	76	3.2		1.6		3.2		1.2		2.2								3.8	
47.3	10.3	77	1			1.1	2		2		3.1									
12.9	9.5	78					+		+		+		+							
35.1	4.8	79							+		+									
35.9	5.5	80							+		+						+			
37.3	5.7	81							+											
45.7	9.1	82									+		+							
57.3	6	83	2				2.3		5.1		3.2		1.1				3		9.1	
62.4	6.3	84	+		+		+				+		+							
39.3	6.1	85															+			
15.7	5	86															+			
14.9	5	87															+			

2.3.2. Induzierte in vitro translatierte Proteine nach 4 h Starklicht-Exposition (Ernte 2)

Tab. 40: In vitro translatierte Proteine unter Starklicht-Exposition bezogen auf den Starklicht-Nullwert, deren Translationsmuster nach 4 h Starklicht-Behandlung ($\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\text{UV-B}_{\text{BE}} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$; s. Ernteschema S. 72) induziert vorlagen. Die MG- (kDa) und die pI -Bereiche (pH-Einheiten) der Proteine sind in Gruppen unterteilt. Proteine, die im Vergleich zum Starklicht-Nullwert neu nachgewiesen werden konnten, wurden mit „+“ gekennzeichnet.

MG-Bereich	saurer pI				neutraler pI				basischer pI			
	MG	pI	Faktor	Protein	MG	pI	Faktor	Protein	MG	pI	Faktor	Protein
< 30 kDa	13.6	5.1	2.1	7	13.8	6.5	4.4	10				
					26,5	6,75	1,7	19				
30 - 60 kDa	30.2	6.4	2.1	22	30.5	6.6	2	23	31.8	9.2	+	31
	38	6.1	3.1	36	45.2	6.6	1.7	72	34.5	9.1	+	32
	47.3	6.35	1.9	44	47.9	6.65	2.6	45	49	9.9	3.2	76
	52.7	6.4	1.7	49	53.1	6.55	1.9	50	51.5	9.1	1.7	34
	56.9	5	1.7	74	55	6.65	3.3	75				
	57.3	6	2	83	59.6	6.55	2.3	53				
	57.3	6.4	1.6	52								
> 60 kDa	62.4	6.3	+	84	62.8	6.65	1.7	55	66.1	9.4	2.4	35
	66.1	6	2.1	60								
	76.7	4.2	2.4	63								
	77.6	5.1	6	62								
	80.4	6.35	1.7	61								
	90.8	5.95	2.8	65								

2.3.3. Reprimierte in vitro translatierte Proteine nach 4 h Starklicht-Exposition (Ernte 2)

Tab. 41: In vitro translatierte Proteine zum Erntezeitpunkt 2 ($\text{PAR } 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\text{UV-B}_{\text{BE}} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$; s. Ernteschema S. 72), die im Tagesgang reprimiert wurden. Ebenso sind die MG (kDa) und pI -Werte (pH-Einheiten) der Proteine gruppiert angegeben.

MG-Bereich	saurer pI				neutraler pI			
	MG	pI	Faktor	Protein	MG	pI	Faktor	Protein
< 30 kDa	13	4.6	1.9	6				
	13	5.3	3.3	8				
	13.5	4.2	3	5				
	14.7	5.5	1.6	9				
	16.6	4.5	2.9	4				
	19.5	5.25	1.7	2				
30 - 60 kDa	43.9	5.5	1.9	41	50	7	2.1	47

2.3.4. Induzierte *in vitro* translatierte Proteine nach 7 h Starklicht-Exposition (Ernte 3)

Tab. 42: *In vitro* translatierte Proteine, die zum Erntezeitpunkt 3 (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV- $B_{BE} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$; s. Ernteschema S. 72) im tageszeitlichen Verlauf induziert wurden. Die MG (kDa) und pI -Werte (pH-Einheiten) der Proteine sind in Gruppen eingeteilt. Proteine, die im Vergleich zum Starklicht-Nullwert neu nachgewiesen werden konnten, wurden mit „+“ gekennzeichnet.

MG-Bereich	saurer pI				basischer pI			
	MG	pI	Faktor	Protein	MG	pI	Faktor	Protein
< 30 kDa	13,8	6,5	2,1	10				
	27,7	6,25	+	18				
30 - 60 kDa					31,8	9,2	+	31
					34,5	9,1	+	32
					49	9,9	1,6	76
> 60 kDa	62,4	6,3	+	84				
	77,6	5,1	9,8	62				
	90,8	5,95	4,2	65				

2.3.5. Induzierte und reprimierte *in vitro* translatierte Proteine nach 10 h Starklicht-Exposition (Ernte 4)

Tab. 43: *In vitro* translatierte Proteine, deren Translationsmuster anfangs unverändert blieb und zum Erntezeitpunkt 4 (PAR 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV- $B_{BE} < 0,5 \text{ mW m}^{-2}$; s. Ernteschema S. 72) während des Tagesganges induziert (links) oder reprimiert (rechts) wurden. Proteine, die im Vergleich zum Starklicht-Nullwert neu nachgewiesen werden konnten, wurden mit „+“ gekennzeichnet. Die MG-Bereiche (kDa) und die pI -Werte (pH-Einheiten) der Proteine sind gruppiert angegeben.

pI-Bereich	Induziert				Reprimiert			
	MG	pI	Faktor	Protein	MG	pI	Faktor	Protein
sauer	28,7	5,65	6,1	21				
	50,9	5,5	4,5	48				
	57,3	6,2	2,5	51				
	45,7	5,95	5,2	70				
	48,3	5,9	7	68				
	59,6	5	4,4	73				
	64,6	5,3	2,7	59				
	66,1	4,2	8,3	64				
	69,2	4,7	13,3	66				
	65,3	4,75	10,1	67				
neutral	17,7	7,2	1,9	14				
	40,9	6,9	2,5	37				
	61,7	6,55	5,4	54				
basisch	12,9	9,5	+	78	32	8,3	2,7	30
	16	7,9	3,5	13				
	47,3	10,3	2	77				

3. Isolierte Klone mittels der DDRT-PCR nach erhöhter UV-B-Behandlung

3.3. Effekte anhand der Northern-Blot Analysen

Die genaue Durchführung der Northern-Blot ist in Material & Methoden bereits beschrieben. Die Gele vor Durchführung des Kapillar-Blots sind hier nochmals gesammelt dokumentiert.

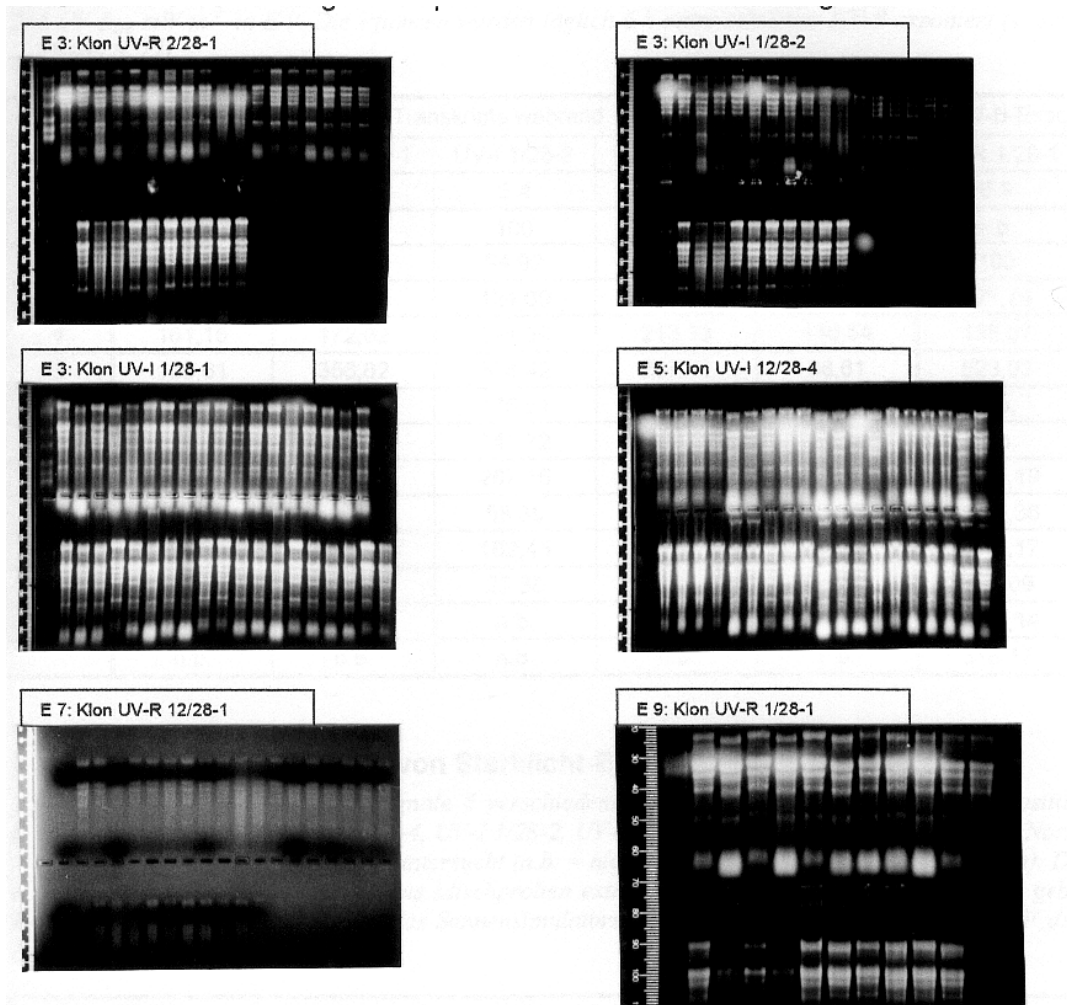


Abb. 59: Es wurden je Blot 10-15 µg Gesamt-RNA aus den Primärblättern der Buche *Fagus sylvatica* L. elektrophoretisch auf einem denaturierenden Formaldehydgel (1,5 % Agarose) aufgetrennt. Durch das zugegebene Ethidiumbromid im Probenpuffer erfolgte eine direkte Anfärbung der ribosomalen Banden der RNA. Links wurde jeweils 12 µg eines Größenstandards (RNA-Marker I, Boehringer Mannheim) zur Größenbestimmung mit aufgetragen.

Die RNA-Gele mit E 3 tragen folgende Spuren (von links nach rechts 1. und 2. Reihe): 7 Erntezeitpunkte unter Schwachlicht-Exposition, 11 Erntezeitpunkte unter Starklicht-Exposition und 10 Erntezeitpunkte unter erhöhter UV-B-Exposition.

Die RNA-Gele mit E 5 tragen folgende Spuren (von links nach rechts): 7 Erntezeitpunkte unter Schwachlicht-Exposition, 7 Erntezeitpunkte unter Starklicht-Exposition und 5 Erntezeitpunkte unter erhöhter Ozon-Exposition.

Die RNA-Gele mit E 7 tragen folgende Spuren (von links nach rechts): 6 Erntezeitpunkte unter Starklicht-Exposition, 6 Erntezeitpunkte unter erhöhter Ozon-Exposition und 6 Erntezeitpunkte unter erhöhter UV-B-Exposition kombiniert mit erhöhter Ozon-Exposition.

Die RNA-Gele mit E 9 tragen folgende Spuren (von links nach rechts): 11 Erntezeitpunkte unter Starklicht-Exposition (1. Reihe) und 10 Erntezeitpunkte unter erhöhter UV-B-Exposition (2. Reihe).

3.3.1. Klone in Abhängigkeit von erhöhter UV-B-Exposition

Tab. 44: Relative Hybridisierungssignale 6 verschiedener Buchen-Klone unter erhöhter UV-B-Exposition im zeitlichen Verlauf. Der Klon UV-I 12/28-4 wurde in Northern-Blots aus verschiedenen Experimenten (E) untersucht (n.b. = nicht bestimmt). Die RNA für die Northern-Blot Analysen wurde aus Mischproben von mehreren Pflanzen isoliert und geblottet: E 4 n=6, E 8 n= 5-7 und in E 9 n=10-12. Das Experiment E 4 wurde im Prototyp des Sonnensimulators der GSF durchgeführt und E 9 im Sonnensimulator. Die Pflanzen wurden in den 2 Experimenten unter erhöhter UV-B-Strahlung exponiert: Plant damage 430 UV-B_{BE} mW m⁻² in E 4 und 285 UV-B_{BE} mW m⁻² in E 9. Die Pflanzen wurden täglich 6 h unter erhöhtem UV-B exponiert (s. Ernteschemas S. 50 und S. 72).

[illegible]

3.3.2. Klone in Abhängigkeit von Starklicht-Behandlung

Tab. 45: Relative Hybridisierungssignale 6 verschiedener Buchen-Klone unter Starklicht-Exposition im zeitlichen Verlauf. Die Klone UV-I 12/28-4, UV-I 1/28-2, UV-R 12/28-1 und UV-R 2/28-1 wurden in Northern-Blots aus verschiedenen Experimenten (E) untersucht (n.b. = nicht bestimmt; n.n. = nicht nachgewiesen). Die RNA für die Northern-Blot Analysen wurde aus Mischproben extrahiert (E 4 n=6 / E 9 n=10-12) und geblottet. Das Experiment E 4 wurde im Prototyp des Sonnensimulators und E 9 im Sonnensimulator der GSF durchgeführt (s. Ernteschemas S. 72).

[illegible]

3.3.3. Durch erhöhte Ozon-Begasung (300 ppb) induzierte Klone

Tab. 46: Relative Hybridisierungssignale 4 verschiedener Buchen-Klone UV-I 12/28-4, UV-I 1/ 28-2, UV-R 12/28-1 und UV-R 2/28-1 unter Ozon-Begasung (300 ppb 8 h täglich) im zeitlichen Verlauf. Die RNA für die Northern-Blot Analysen wurde aus Mischproben(E 5 n=10 (Ausnahme 51 h: n=4), E 7 n=8) isoliert und geblottet. Alle Experimente wurden im Prototyp des Sonnensimulators der GSF durchgeführt. Die Pflanzen wurden täglich 8 h mit 300 ppb Ozon begast (s. Ernteschema S. 75); anschließend wurden die Pflanzen unter Reinluft weiter kultiviert. Der Klon UV-I 1/28-2 wurde mit den Northern-Blot Analyse aus E 5 und der Klon UV-R 2/28-1 mit dem Northern-Blot aus E 7 hybridisiert.

Relative Hybridisierungssignale der Transkripte im Tagesgang unter erhöhter Ozon-Exposition (%)		
Klon	UV-I 1/28-2	UV-R 2/28-1
Ernte	E 5	E 7
1	100	100
2	148,4	75,53
3	327,02	55,09
4	147,92	42,97
5	129,32	25,89
6	530,07	n.b.

3.3.4. Klone in Abhängigkeit von erhöhter UV-B/Ozon-Behandlung

Tab. 47: Relative Hybridisierungssignale des Buchen-Klones UV-R 2/28-1 unter kombinierter UV-B-Exposition und erhöhtem Ozon (300 ppb 8 h täglich) im zeitlichen Verlauf. Die RNA für die Northern-Blot Analysen wurde aus Mischproben (E 7 n=8) isoliert und geblottet. Die Experimente wurden im Prototyp des Sonnensimulators der GSF durchgeführt. Die Pflanzen wurden täglich 8 h mit 300 ppb Ozon begast und zugleich täglich unter erhöhter UV-B-Strahlung (Plant damage 390 UV-B_{BE} mW m⁻² in E 7) exponiert (s. Ernteschema S. 75).

Relative Hybridisierungssignale des Transkriptes im Tagesgang unter erhöhter UV-B/Ozon-Behandlung (%)	
Klon	UV-R 2/28-1
Ernte	E 7
1	100
2	118,38
3	117,8
4	124,99
5	225,63

3.4. Sequenzanalysen von UV-B-induzierten Buchen-Klonen (=UV-I)

Abgebildet sind die Sequenzen der Buchen-Klone, die im Datenbankvergleich keine Homologien ergaben. Diese Klone wurden durch das Differentielle Display isoliert.

1. Klon UV-I 5/28-1

```

1   TGGACTGGAG TTAACACCGA ACCACGTGTC TTTCGGCCCA GCAGCGCATA
51  GTGTGGGCGG TGCAGGAGCC GAGACGGGCA GGAACCACCG CAGGAGGGGG
101 TGAGATTTAG GGCAGCCCCA TAGCACCCTC CCCGTGCCAG GCAGGTGTAG
151 GCGCCAAGCG CATGGGGCGC TGAAGAGTTG GCTGGGGTGC CAGGCTTTTC
201 AAGTTTCCCC ACACTTGCTT TTAAACCTAG ATCAAAGTGA TCCAAAGTCT
251 GCATGTAAAT CCGAGAGCTC ATTTATTTTA TTTACAAAAT CATTGAGCGT
301 CTACTGTGTA TGATTCAGGG AATGAGACAC ACCCCAGGGA TACTCCAGTG
351 AACAAAAGAA AGGTGTTGGT CCGAAGACAG TTATTTTAAA AATTACACAT
401 CTAATGCCAT AATGCCAGGA TTGGTGGCTC ATGCGTGTAA CCTCAACACT
451 TCGGGAGGAC CAGGCGAGAG GATCGCTTGA GGCCAGGAAT TTGAGACCAG
501 CCTGGGCAAA CACGGCGAGA CCTGGAGTGG CTAGGAGACT GAGGTGGGAG
551 GATCGCCTGA GCCCAGGAGT TCAAGGCTGC AGCGGGCTAT GATCGCATCA
601 CTGCACTCCA GTCCAATCA

```

2. Klon UV-I 5/28-3

```

1   GGACTGGAGT TGGGGAATAA ATTAGGAAGG ACACGGACTC AAGCAAAGGA
51  AGACATCAGA AGTAGAGGTT GGCCAAAGGA CAAACTACA AAGCAGCAAT
101 TGCAGATTGA ATCAAATCAT CAGCTACTGG ACATTACAAC ATTCACCATG
151 GAGAGTAACA ATAATATGCA TTTCATCAGA ACCTTCACTA TGTGCCAGGC
201 ACAACATTTT ATGGAAGATG ACAGGTTGAT AGACAACCGA AGATGAGTAC
251 CTTACTAGGT TAGTAGGTTA AATGGTTNAC AGGAATCTCT GTCTCCCTAA
301 TCCCTCNTGG TTAACAAAAA AAAGCTAATG ACTTCCAAAG CCTTACTGTT
351 GCCTTCCCAT ATTCCCTAAA AAGGCTCTGT TTTTTGTGTT TGAAAAAAA
401 CCCCAGGACG GCATGCTTGT TCCANTTAAA AAATACGGTA TTTTGGTTAA
451 CTAACCTTTT TAAGCCTGGG TGAGGAATAT TGGTGCAGTA TTTACCCCCC
501 CCGGGAAAAA AACCNTTTN TTTTATAAN CCCNTCCAAC CCTAATTTGG
551 GCCCCGCGGT CAACNTTTG GAAACCCCC CCTTTGNGGC CAACCTGATT
601 TTCCATTTT CCCCCAAAAC NGGGGTTNCC CGGGCCACNT TCCCTTTNTA
651 AATTTTNNCC CCCNNCCCC

```

3. Klon UV-I 5/29-1

```

1   GAGCTTGAAC TACACAGGTC CACTTATCCA CAGATTTTCT TCCGTCTCTG
51  CCACCACTGA GACAGCAAGA CCAACCCTCC CTTTCCCCTC CAGCCTGCTC
101 AATGTGAAGA TGACAACCAG GATGAAGGCC TTTATGATGA TCCACTTCTT
151 TAATGAATTG TAAATATAGT TTATCTTATG ATTTGCTTCC TTTTTTTTGA
201 GACACAGTCT CCTCTGTTGC CCAGGCTGGA GTGCAGTGGT GCCATCTCAG
251 CTCCTGCAA CCTCCGCTC CCAGGTTCAA GCTCA

```

4. Klon UV-I 10/28-2

```

1   GGAGTTGGAT TAAGTGAAAT GCACTTATGA TATGGCTGCA TTGTAATATA
51  CTTTATAAAG TATGCAGAGA AAAGCTTTAG GTCTCTGGAA TACTCACAAA
101 TATAAATGAA CAGTGTTACC CTACAGTAGT CTGTAGGTAT CTATCCTCTA
151 AGTATTAGAA GATCTAGCAA AATTTAAGGA GAAATTGAAA ATAATTAGA
201 CAACAGGAAA AAAAATAGAT GAACCTATT TTAATAAGTA GTATTGAGGC
251 TGGGTGCAGT GGCTCACCTC GTAACCCTAG CACTTTGGGA GGCCAGAAGT
301 TCAAGACTAG CCTGGGCAAC ATTAGAACCC TATCTCTTAC AAAATTAGCC
351 AGTCATGGTG GCATAGCCTC GAGCTAGCT ACCAGAGGCT AGTTGGGATC
401 ACTGACTGGA ATTAGGCTCA T

```

5. Klon UV-I 10/28-3

```

1   TGTTAACTAA TCACTATCAA TTCATTAATC GAAGTCATTA TTATTACAAA
51  CTATACGATT ACTTTATGAT TCAGAATACA CACACCCAGG ATACTCACGA
101 ACAAAAAGAAA GGTGTTGTCTG AAGACATGTA TTTAAAAATTA CACAGCTAAT
151 CCGATAATGC CAGATTGGTG GCTCATCGTG TAACCTCTTC ACTTCGGGAG
201 GACCAGGCCGA GAGGATCGCT TGAGGCCAGG AATTTGAGAC CAGCCTGGGC
251 AAACACAGCG AGACCTGGAG TGGCTAGGAG ACTGAGGTGG GAGGATCGCC
301 TGAGCCCAGG AGTTCAAGGC TGCAGCGGGC TATGATCCGA TATGCACTCC
351 AGTCCAATCA CTAGTGCGGC CGCCTGCAGG TCGACCATAT G

```

6. Klon UV-I 10/28-4

```

1   GGACTGGAGT ATATCTGTGA CAAAGGAAAC ATCAGATAAC ATTTTAAAAA
51  GAATGTATGC TACCATTGTT ATTTTATTA CTACCTGTAG AAGCTTTTAT
101 ACGTGCCCCA AAAGTAGCTA TTTTGGAAAA TGAGTTTGAT CAATAATTAT
151 AACACTTGCA CAAAATATAT TGGTATGCC TTTATAAGTG CATAGGCATG
201 TATAATTTAA AATCACTTAC AATTTAAAAG TTTTAGCCTC TTTTAAAGA
251 TTTTCCTCTT GCCAGGTGTG ATGACTCACA TATGTAATCC CAGCACTATG
301 GTAGGCTAAG GTGGAAGGAT GACTTGAGCC TAGGAGTTCA AGACTAGCCT
351 GGGCACATAG AACCTCTCTC TATAAAAAAT AAAAAAAAT AGCTGGGCAT
401 AGTGGCACAT GCCTATGTGC CAGCAACTCA GAGGCTGAGA TAGAGATGCT
451 TGACCTGGAG TTCAAGGCTA CGCAAGCTAT GATTATACAC TGCACCTCAG
501 TTCCAAGCAC ATGCG

```

7. Klon UV-I 12/28-2

```

1   GGACTGGAGT TGACATCAGT GACAGAGAAG AGGAGGAATT ACAGCTAATT
51  TGCTGAAAAT CACACCCATT CTATCTTAGC TATGCCCTATG TAATCTATTCT
101 CACAATTGCC CTTACCTAAC ATAGGCCCTGA TCTTCCTAGA GAAATTCATT
151 ACATGAAGAT CAACAGTCAT GTGTTGCAGC AAGAATGCAC CATAAAAAAT
201 GATCAGTATC TGTTACCTGT CAAATATAAC ACTAAAAATA ATTAATAcCT
251 TGCTGGTGGC TCATGCCGTG AATCCCAGAC TTTGGGAGGC TGAGCAGGTG
301 GATCACAAGG TCAGGAGTTC AAGACAGCTG CCCAACATAG TGAAAACCCC
351 ATTTCTACTG AAGATACAAA AAAATTAGCC AGGCGTGGTG GcACGCACCT
401 GTAATCTCAG CTACTTGGGA GGCTGAGGCT GGAGAATCGC TTGAACCTAG
451 GAGGCAGAGG TTGCAGTGAG CAGAGATCAT GCCATTCCAC TCCAGTCCA

```

8. Klon UV-I 12/28-4

```

1   CCGACGGCCT NATTCTCCCT GCCGNAAGG ACGCGGGATT GGACTGGAAT
51  AACAAGGGAC TGTCTCATAA AAATGCTAAA GATATANACA GAAGAAACAT
101 CCCCTACCCT AGGGCTAAGA CGGGGTGCC AAAAGAGAGG GTCCCCCTCC
151 TTCAGGACTG AGTTGTAGAC CTTGTTGGAG GACATAGCGT GGCTTATTGA
201 ATGGCAGGAA ATTATCTGTG GTGCTGTGCC AGCAAAACCT GTTGGTACTT
251 CACTCTCTGG AACTTTCTGG AAATTACTTT TAGGGAGCCT CATGGAGGGG
301 TGTCTCTCTG AATGCACTCC AGTCCAATCA CTAGTGCGGC CGCCTGCAGG
351 TCGACCATAT GGGAGAGCTC CCAACGCGTT GGATGCATAG CTTGAGTATT
401 CTATAGTGTC ACCTAAATAG CTTGGCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC
451 TGTGTGAAAT TGTTATCCGC TCACAATTCC ACACAACATA CGAACC GGAA
501 GCATAAAGTT GTTAAGCCTG GGGTGCCTAA TGANTTAGCT AACTCNCATT
551 AATTGCGTTT GCGCTCACTG CCCGCTTTCC AGTCNGGAAA ACTGTTCTTG
601 CCCAGCTGCA TTAATNAATC CGGCCANCCC CCGGGGAAAAG GCGGTTTGCC
651 TTTTGGGNG CCCTTCCCT TCCCCCTCC AATNAATCCC CTGCGCNCGG
701 TCNTTCGGNT GGGAAACGNA TNANCCCCC

```

3.5. Sequenzanalysen von UV-B-reprimierten Klonen (=UV-R)

1. Klon UV-R 10/28-2

```

1  GGACTGGAGT TCACTGGTGC AATCATAGCT CATTTC AACC TTGACTTCCT
51  GAGCTCAAGC AATCCTCCCA CCTCAGCCTC CCAAGTAGCT GGGATTACAG
101 GTGTGCACAA CCACACCCAG CTAATTAAAA AAAAAAAAAA AGTAGAGATG
151 GGGGTCTCCT TATGTTGTCC AGGATGGTCT TAAACTCCTG AGCTCAAGTG
201 ATCCTCCAC CTCAGCCTCC CAAAGTGCTG GGATGGCAGG TGTGAGCCAC
251 TGCACCCAGC TCTATTTTCT TTTTGTCCAT CAGAACATAC CTCAAGGGTC
301 ACATCCCTAA GATGATCCTC CCTAAAAACC CTAAATTTTA GAAATGCCCC
351 TTCTCTGGGC TTCTGCAAAG ATCCTCTACA TGCTTCATTC ATGCACTTCT
401 CCAAGGGTTC GTTTCCCAA GACAACGAGT TCCTGAAAGG AAGACACCAC
451 GAGCGTGCCG ACTCCAGTCC A

```

2. Klon UV-R 12/28-1 (laut Northern-Blot Analyse nahezu unverändert, s. S. 71 und S. 73)

```

1  GGACTGGAGT GATACATCTA CCCAGAAACG CCAAGGATCG TGAGTAGATT
51  AATGAAGCTA GCAGAGTGGT ATGGATCAGA TTCTCACTCA GAGACTCTGG
101 AAGAAAGGAA CCCTACCAAT GCCTTCATT ATGACTTCTG GACCCAGAA
151 ATGTGATAGC ATAAATCTCT GTTGTTTTAA GCCACCAAGA TCGTAGACAT
201 TTGTGGCGGC AACCCTAAGA AACTAATACA GGCTATTTTA ATACTTTCGT
251 ATGAGTGTTT TCATTTCTAT TAAATTAGTA AAAAATATAG TACAAATGTA
301 TACCTAACCT AAAACATTGC CAAAGTGTTT TTGCAAAGTA GGTTATATGA
351 TTTTATATTC CTTTACCCTA CTTATGTTTT ATTCTAGTTA TCTTTTATCT
401 TTTCATGTTT AGGTCCGTAC TCCAGTCCAA

```

3. Klon UV-R 12/28-2

```

1  TGGACTGGAG TGTAAGTAAC AGTGTATTTA GTCTGAACAA TTGGTGCAAT
51  ACTGCTTGTT GTTCCCTTAA CTTTTTGATT TTTCAAGTCC TTTATTCATT
101 TTAGAGTCAG ATTTTTACTT TCTAAATTGG ACAAGTGCTT TTGAAAACAT
151 GTTTTCTCCA GTTTCGTATC TTACGTTTTA GCAGCTTTCT GGATTACGT
201 CTCACTTTTT AGTCAGACAT TCAAAGGGAG TTCCAGTGG GCTAAATTC
251 CTTTAAAAGA ACATAATGCT GTTTGAGGTC CTTTCATGAT TCAGGCATAG
301 TACTGAGTGG TTCCATGTGA CTCCAGTCCA ATCACTAGTG CGGCCGCCTG
351 CAGGTCGACC ATATGGGAGA GCTCCCAACG CGTTGGATGC ATACTGAGTA
401 TCAATGTCAC TAATAGCTGG CTAA

```

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie der GSF, Neuherberg, unter der Leitung von Prof. Dr. H. Sandermann erstellt.

Herrn Prof. Dr. H. Sandermann danke ich für die Möglichkeit, dieses interessante Thema zu bearbeiten.

Bei Herrn Dr. habil D. Ernst bedanke ich mich besonders herzlich für seine hervorragende Betreuung und für seine Unterstützung während schwieriger Phasen dieser Arbeit. Weiterhin danke ich ihm für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine konstruktive Korrektur des Manuskriptes.

Für die wertvollen Diskussionen, durch die weitere Aspekte in dieser Arbeit berücksichtigt wurden, danke ich Herrn Dr. W. Heller.

Herrn Dr. H. Seidlitz, Herrn Dr. T. Döhring, Herrn M. Köfferlein und allen anderen EPOKA-Mitarbeitern danke ich für Ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente im Sonnensimulator.

Für die hilfreiche Einweisung in die Methode des automatischen Sequenzierens danke ich Herrn Dr. W. Gimbel (Institut für Molekulare Virologie der GSF, Neuherberg) und Dr. Jürgen Blusch.

Herzlichen Dank an Frau E. Kiefer für die Unterstützung bei den Sequenzanalysen.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes für Molekulare Virologie der GSF, Neuherberg, die mich bei Fragestellungen bezüglich des Phosphorimagers unterstützten, bedanke ich mich an dieser Stelle.

Herrn Dr. Kangasjärvi und seinen Mitarbeitern (University of Kuopio, Finnland) danke ich für die freundliche Atmosphäre in seinem Labor und für die Einführung in die Methode des Differentiellen Displays.

Allen Laborkolleginnen und -kollegen, den Zivildienstleistenden und allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Biochemische Pflanzenpathologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere Frau B. Groß und Frau R. Kreitmeyer möchte ich für ihre - für sie wohl selbstverständliche - Hilfe bei der Buchenanzucht danken.

Ganz besonders herzlich danke ich Frau E. Kiefer, Frau H. Rosenbrock, Frau J. Tuomainen, Frau C. Feicht, Frau Dr. D. Gärtner und Frau H. Chiron, die durch ihre motivierenden Impulse und ihre Freundschaft maßgeblich zur guten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle auch bei früheren GSF Mitarbeitern, bei Frau Dr. H. Eckey-Kaltenbach und Herrn Dr. E. Großkopf, bedanken. Durch die Diskussionen mit ihnen habe ich wertvolle Anregungen erhalten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn H. E. Magiera, meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihr Verständnis und ihre Freundschaft während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Lebenslauf

P E R S Ö N L I C H E A N G A B E N

Geburtsdatum: 08.07.1967

Geburtsort: Vohenstrauß

S C H U L A U S B I L D U N G

1973 - 1977

Grundschule Eslarn

1977 - 1986

St. Michaels-Gymnasium Metten

S T U D I U M

1986 - 1993

Universität Bayreuth

Diplomstudium der Biologie

Thema der Diplomarbeit: Das Cytokininmuster im Xylem- und Phloemsaft von *Ricinus Communis* L..

1993 - 1994

Universität Bayreuth

Wissenschaftliche Hilfskraft

Seit 1994

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg
Promotionsarbeit

B E R U F S W E G

Seit 01.08.1997

Promega GmbH, Mannheim

Field Application Specialist

A U S L A N D S A U F E N T H A L T

August 1995

Dr. Kangasjärvi, Department of environmental sciences,
Ecology Lab, University of Kuopio (Finnland)

A U S Z E I C H N U N G

1996

Boehringer Mannheim, Mannheim:
4. Preis beim PCR-Award for young scientists

Q U A L I F I K A T I O N E N

1995

Fortbildung für Projektleiter und Beauftragte für die Biologische Sicherheit

1997

Betriebswirtschaftliches Seminar, GSF-Neuherberg